



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

농학석사 학위논문

실크 세리신을 환원제 및 캡핑제로
활용한 친환경 금 나노입자 합성

Green Synthesis of Gold Nanoparticles Using
Silk Sericin as Reducing and Capping Agent

2017 년 8 월

서울대학교 대학원
바이오시스템·소재학부
바이오소재공학전공
신 문 주

실크 세리신을 환원제 및 캡핑제로
활용한 친환경 금 나노입자 합성

Green Synthesis of Gold Nanoparticles Using
Silk Sericin as Reducing and Capping Agent

지도교수 이 기 훈

이 논문을 농학석사 학위논문으로 제출함
2017 년 5 월

서울대학교 대학원
바이오시스템·소재학부
바이오소재공학전공
신 문 주

신문주의 석사 학위논문을 인준함
2017 년 6 월

위 원 장 박 영 환 (인)

부위원장 이 기 훈 (인)

위 원 기 창 석 (인)

초 록

최근 다양한 천연 물질들이 금 나노입자의 합성 및 형태학적 구조 제어에 이용되고 있으며, 이는 친환경적이라는 점에서 주목을 받고 있다. 실크 세리신은 실크 단백질의 25%(w/w)를 차지하는 친수성 고분자로 하이드록시 아파타이트나 실리카 등의 무기물을 합성하는데 템플릿으로 이용된바 있다. 본 연구에서는 실크 세리신을 이용하여 금 나노입자의 합성을 시도하였다. 합성의 최적 조건을 규명하기 위하여 반응 pH, 실크 세리신의 농도, 반응 시간 및 온도에 따른 금 나노입자의 형성 여부를 육안 관찰, UV-Vis 분광광도계 그리고 EF-TEM을 이용하여 확인하였다. 그 결과 실크 세리신을 이용하여 금 나노입자를 합성하는 최적 조건은 HAuCl_4 의 농도가 1 mM인 경우 실크 세리신의 농도는 1 mg/ml, 반응 pH는 7, 반응 온도는 70°C에서 12시간이상 반응임을 확인하였다. 제조된 금 나노입자는 약 17 nm의 크기를 가졌으며, 입자의 분산도 잘 이루어졌다. 또한 에탄올을 첨가하는 경우 실크 세리신의 이차 구조가 β -sheet로 전이됨에 따라 금 나노입자의 크기는 약 20 nm로 증가하였으며, 합성 양도 증가하였다. 실크 세리신을 구성하는 아미노산 중 하이드록실기를 갖는 아미노산과 음전하를 나타내는 아미노산이 금 나노입자 합성에 효과적임을 확인하였으며, 실크 세리신에 존재하는 이러한 아미노산이 금 나노입자 합성에서 금 이온을 환원시키는 것으로 추측된다. 또한 HR-TEM, EDS, TGA 분석을 통하여 실크 세리신이 합성된 금 나노입자를 캡핑하는 형태로 잔존하고 있는 것을 알 수 있었으며, FITC 형광 염료를 실크 세리신에 공유결합시킴으로써 금 나노입자에 직접 도입할 수 있었다. 이처럼 실크 세리신으로 캡핑된 금 나노입자는 진단 또는 바이오이미징 등 바이오메디컬 분야에 활용될 수 있을 것으로 기대된

다.

주요어 : 금 나노입자, 실크 세리신, 생광물화, 환원제, 캡핑제,
친환경 합성

학 번 : 2015-23029

목 차

| | |
|--------------------------------------|-----|
| 초 록 | i |
| 목 차 | iii |
| List of Figures | vi |
| | |
| 제 1 장 서론 | 1 |
| | |
| 제 2 장 문헌 연구 | 4 |
| 2.1. 생광물화 | 4 |
| 2.1.1. 생광물화의 원리 | 5 |
| 2.1.2. 실크 세리신을 이용한 생광물화 | 5 |
| | |
| 2.2. 실크 세리신을 이용한 금속 나노입자 합성 | 6 |
| | |
| 2.3. 금 나노입자 | 7 |
| 2.3.1. 금 나노입자의 화학적 합성 | 8 |
| 2.3.2. 금 나노입자의 생합성 | 10 |
| 2.3.3. 금 나노입자의 크기와 형태 | 12 |
| 2.3.4. 금 나노입자의 표면 개질과 바이오컨쥬게이션 | 13 |
| | |
| 제 3 장 재료 및 방법 | 14 |
| 3.1. 재료 | 14 |

| | |
|---|-----------|
| 3.1.1. 실크 세리신의 추출 | 14 |
| 3.2. 방법 | 15 |
| 3.2.1. 금 나노입자의 합성 조건 | 15 |
| 3.2.1.1. 실크 세리신의 pH 및 농도 | 15 |
| 3.2.1.2. 반응 시간 및 반응 온도 | 15 |
| 3.2.1.3. 실크 세리신의 이차 구조 | 16 |
| 3.2.1.4. 실크 세리신을 구성하는 아미노산 | 16 |
| 3.2.2. 금 나노입자의 분석 | 16 |
| 3.2.2.1. 금 나노입자의 구조 특성 | 16 |
| 3.2.2.2. 캡핑된 실크 세리신을 활용한 FITC 도입 | 18 |
| 제 4 장 결과 및 고찰 | 19 |
| 4.1. 실크 세리신을 이용한 금 나노입자 합성의 최적 조건 | 19 |
| 4.1.1. 실크 세리신의 pH에 따른 영향 | 19 |
| 4.1.2. 실크 세리신의 농도에 따른 영향 | 26 |
| 4.1.3. 반응 시간에 따른 영향 | 32 |
| 4.1.4. 반응 온도에 따른 영향 | 32 |
| 4.1.5. 트립신 및 BSA를 이용한 금 나노입자 합성 | 39 |
| 4.1.6. 실크 세리신의 이차 구조에 따른 영향 | 41 |

| | |
|--|----|
| 4.2. 실크 세리신을 이용해 합성한 금 나노입자의 구조 특성 | 47 |
| 4.3. 금 나노입자 합성에서의 실크 세리신의 역할 | 53 |
| 4.3.1. 실크 세리신 구성 아미노산에 따른 영향 | 53 |
| 4.3.2. 금 나노입자 합성에서의 실크 세리신의 역할 규명 | 57 |
| 4.4. 실크 세리신으로 캡핑된 금 나노입자의 응용 | 62 |
| 제 5 장 결론 | 64 |
| 참고문헌 | 66 |
| Abstract | 78 |

List of Figures

- Figure 1.** Mechanism of citrate decarboxylation (a) and the reduction of gold ion by sodium citrate (b). 9
- Figure 2.** Zeta potential of silk sericin (SS) solution (1 mg/ml) at pH 2, 4, 7 and 9. 20
- Figure 3.** Optical images of gold colloids prepared at different pH. From left to right, the pH of medium was 2, 4, 7 and 9. For each reaction, the initial concentrations of SS and HAuCl_4 were 1 mg/ml and 1 mM, respectively. The reaction was carried out for 24 hours at 55°C. 22
- Figure 4.** UV-Vis spectra of gold colloids prepared at different pH. For each reaction, the initial concentrations of SS and HAuCl_4 were 1 mg/ml and 1 mM, respectively. The reaction was carried out for 24 hours at 55°C. 23
- Figure 5.** EF-TEM images of precipitates (pH 2) and gold nanoparticles (AuNPs) in the colloids (pH 4, 7 and 9): (a) low magnification and (b) high magnification. For each reaction, the initial concentrations of SS and HAuCl_4 were 1 mg/ml and 1 mM, respectively. The reaction was carried out

| | | |
|-------------------|--|----|
| | for 24 hours at 55°C. | 24 |
| Figure 6. | Optical images of gold colloids prepared at different concentrations of SS. The initial concentration of HAuCl ₄ was 1 mM, and the reaction was carried out up to 24 hours at pH 7 and 55°C. | 27 |
| Figure 7. | UV-Vis spectra of gold colloids prepared at different concentrations of SS. The initial concentration of HAuCl ₄ was 1 mM, and the reaction was carried out for 24 hours at pH 7 and 55°C. | 28 |
| Figure 8. | EF-TEM images of AuNPs in colloids prepared at different concentrations of SS. The initial concentration of HAuCl ₄ was 1 mM, and the reaction was carried out for 24 hours at pH 7 and 55°C: (left) low magnification and (right) high magnification. | 30 |
| Figure 9. | Size distribution of the AuNPs prepared at different concentrations of SS. The initial concentration of HAuCl ₄ was 1 mM, and the reaction was carried out for 24 hours at pH 7 and 55°C. Error bar indicates standard deviation. | 31 |
| Figure 10. | UV-Vis spectra of gold colloids recorded with designated time interval at different reaction temperature conditions. For each reaction, the initial | |

concentrations of SS and HAuCl₄ were 1 mg/ml and 1 mM, respectively. The pH was adjusted at 7: (a) 55°C, (b) 70°C, and (c) 85°C. 33

Figure 11. Optical images of gold colloids prepared at different reaction times and temperatures: (a) 2, (b) 4, (c) 6 and (d) 8 hours. For each reaction, the initial concentrations of SS and HAuCl₄ were 1 mg/ml and 1 mM, respectively. The pH was adjusted at 7. 35

Figure 12. The increase of maximum absorbances in UV-Vis spectra of gold colloids up to 48 hours at different reaction temperature. For each reaction, the initial concentrations of SS and HAuCl₄ were 1 mg/ml and 1 mM, respectively. The pH was adjusted at 7. The inset figure shows the results of first 8 hours. 36

Figure 13. EF-TEM images of AuNPs in colloids prepared at different reaction temperatures for 8 hours: (a) low magnification and (b) high magnification. For each reaction, the initial concentrations of SS and HAuCl₄ were 1 mg/ml and 1 mM, respectively. The pH was adjusted at 7. 37

Figure 14. Size distribution of AuNPs prepared at different reaction temperatures for 8 hours. The size data

were obtained from EF-TEM image analysis (a) and DLS measurement (b). For each reaction, the initial concentrations of SS and HAuCl_4 were 1 mg/ml and 1 mM, respectively. The pH was adjusted at 7. Error bar indicates standard deviation. 38

Figure 15. Optical images of gold colloids prepared with trypsin and BSA. For each reaction, the initial concentrations of trypsin and BSA were 1 mg/ml, respectively. The reaction was carried out at pH 7 and 70°C for 12 hours. 40

Figure 16. Optical images of gold colloids prepared with different SS:ethanol compositions. From left to right, the SS:ethanol compositions (v/v) were 10:0, 9.5:0.5, 9.0:1.0, 8.5:1.5, and 8.0:2.0. For each reaction, the initial concentrations of SS and HAuCl_4 were 1 mg/ml and 1 mM, respectively. The reaction was carried out at pH 7 and 70°C for 12 hours. 42

Figure 17. UV-Vis spectra of gold colloids prepared with different SS:ethanol compositions. For each reaction, the initial concentrations of SS and HAuCl_4 were 1 mg/ml and 1 mM, respectively. The reaction was carried out at pH 7 and 70°C for 12 hours. 44

Figure 18. EF-TEM images of AuNPs in gold colloids prepared with different SS:ethanol compositions: (a) low magnification and (b) high magnification. For each reaction, the initial concentrations of SS and HAuCl₄ were 1 mg/ml and 1 mM, respectively. The reaction was carried out at pH 7 and 70°C for 12 hours. 45

Figure 19. Size distribution of AuNPs prepared with different SS:ethanol compositions. For each reaction, the initial concentrations of SS and HAuCl₄ were 1 mg/ml and 1 mM, respectively. The reaction was carried out at pH 7 and 70°C for 12 hours. Error bar indicates standard deviation. 46

Figure 20. XRD spectrum of AuNPs prepared at optimum reaction condition. The initial concentrations of SS and HAuCl₄ were 1 mg/ml and 1 mM, respectively. The reaction was carried out at pH 7 and 70°C for 12 hours. 48

Figure 21. EDS spectral analysis of AuNPs prepared at optimum reaction condition. The initial concentrations of SS and HAuCl₄ were 1 mg/ml and 1 mM, respectively. The reaction was carried out at pH 7 and 70°C for 12 hours. 49

- Figure 22.** TGA curves of AuNPs-citrate (AuNPs synthesized by Turkevich method), AuNPs-SS (AuNPs synthesized with SS) and Silk Sericin. 50
- Figure 23.** HR-TEM images of AuNPs prepared at optimum reaction condition: (a) AuNP diameter and capping thickness of SS, (b) lattice spacing of Au and (c) SAED pattern. The initial concentrations of SS and HAuCl₄ were 1 mg/ml and 1 mM, respectively. The reaction was carried out at pH 7 and 70°C for 12 hours. 52
- Figure 24.** Optical images of gold colloids after mixing each amino acid solution with HAuCl₄. The initial concentrations of amino acid and HAuCl₄ were 0.034 M and 1 mM, respectively. The reaction was carried out at pH 7 and 70°C for 30 mins. 54
- Figure 25.** UV-Vis spectra of gold colloids after mixing each amino acid solution with HAuCl₄. The initial concentrations of amino acid and HAuCl₄ were 0.034 M and 1 mM, respectively. The reaction was carried out at pH 7 and 70°C for 30 mins. 55
- Figure 26.** The change of pH of reaction media after 48 hours of reaction. The initial concentrations of SS and HAuCl₄ were 1 mg/ml and 1 mM, respectively. The

| | |
|--|----|
| reaction was carried out at 70°C. | 58 |
| Figure 27. EF-TEM images of AuNPs synthesized by Turkevich method. | 60 |
| Figure 28. Proposed role of SS during the synthesis of AuNPs: (a) reduction of gold ion by hydroxyl groups, (b) formation of Au nuclei and (c) final model of SS capped AuNP. | 61 |
| Figure 29. Fluorescent microscope images of AuNPs synthesized by Turkevich method (a), SS capped AuNPs (b) and FITC labeled SS capped AuNPs (c): (left) optical microscope, (right) fluorescent microscope images. | 63 |

제 1 장 서 론

생광물화(biomineralization)란 살아있는 생물체가 무기물을 생산하는 과정을 말하며, 이러한 무기물은 대체로 유기물과 복합되어 있는 형태로 존재한다 [1]. 흔히 찾아볼 수 있는 예로는 동물들의 뼈나 부리, 조개 및 갑각류의 껍질, 규조류 및 해면류의 실리카 등이 있다. 이 때 생물체는 온화한 상온·상압의 제한적인 환경에서 용도에 맞는 무기물을 생산하기 위하여 생체 분자를 이용하며, 다양한 크기와 모양 및 특성을 갖는 미네랄을 제조한다. 특히 이렇게 생성된 복합재료들은 정교하고 우수한 물성 등의 장점을 가진다 [2,3]. 이러한 자연계의 현상을 관찰하고, 필요한 기능을 인위적으로 모방하여 이용하는 기술을 생체모방기술(biomimetics)이라고 부른다.

한편 생광물화는 누에가 방사하는 실크에서도 발견되었다. 야생 누에 고치 표면에 소량 존재하는 옥살산칼슘(calcium oxalate)은 실크를 이루는 단백질의 생광물화 가능성을 말해준다 [4]. 이러한 현상을 모방하여 실크를 구성하는 실크 단백질 중 세리신(sericin)을 이용해 하이드록시아파타이트[5], 실리카[6], 칼슘 카보네이트[7] 등의 무기물을 합성하는 연구가 진행되었다. 실크 세리신은 세린과 아스파틱산 등 극성 아미노산을 다량 함유하는 친수성 고분자로 실크의 정련 과정 중에 버려진다. 하지만 이를 회수해 활용하려는 연구가 많이 진행되었다. 이러한 연구 중 실크 세리신을 이용해 다양한 금속을 흡착하는 시도가 있었으며, 이 때 세리신 표면에서 금속 이온들이 환원되면서 흡착되는 것을 알 수 있었다 [8].

금 나노입자는 수에서 수백 나노미터의 크기를 가지는 금 미세 입자로써 기존에 귀금속으로 사용되는 벌크한 금과는 매우 다른 물리화학적 특

성을 가진다. 또한 이러한 특성들은 금 나노입자의 크기와 모양의 조절로 제어되기 때문에, 이와 관련된 연구가 많이 진행되고 있다. 기존의 금 나노입자의 합성은 화학적 환원에 기반한 방법으로 시트르산이나 아스코르브산, 수소화 붕소 나트륨 등을 환원제로 사용하였으며, 환원제와 전구체의 비율, 반응 pH, 반응 온도 등을 조절하여 금 나노입자의 크기와 모양을 조절하였다 [9]. 하지만 이 때 금 나노입자의 응집을 제한하는 안정제를 추가하거나 싸이올 기반의 안정제로 표면 개질하는 경우 부산물을 생성하거나 유기 용매를 필요로 하여 이 후 생물학적 응용분야에 부적합하다는 단점이 있다 [10]. 따라서 최근에는 천연 성분을 환원제 및 안정제로 이용하여 금 나노입자를 생합성하고 동시에 표면 개질 효과를 얻는 연구가 진행되고 있다. 실제로 식물 추출물, 탄수화물, 단백질, 미생물, 효소 등으로 금 이온을 환원시킬 수 있었으며, 이들은 기존 화학적 합성법과 다르게 금 나노입자의 응집을 막아주는 추가적인 안정제를 첨가하지 않아도 된다는 장점이 있었다 [11]. 뿐만 아니라 싸이올 기반 안정제로 치환하지 않고 바로 단백질이나 형광 염료, 항체, 약물 등으로 바이오컨쥬게이션하여 다양한 생물학적 응용 분야에 사용할 수 있었다 [12].

이와 같이 금속 나노입자의 합성에 있어 다양한 천연 성분이 활용되다는 점과 실크 세리신이 금속을 환원하여 흡착하는 점에 착안하여 실크 세리신의 새로운 용도를 찾고자 하는 목적으로 실크 세리신을 이용한 금 나노입자의 합성을 시도하였다. 우선 금 나노입자 합성 최적 조건을 규명하기 위하여 반응 pH, 실크 세리신의 농도, 반응 시간, 온도 및 실크 세리신의 이차 구조 등을 조절하였으며, 실크 세리신이 금 나노입자를 합성하는데 있어 이러한 요인들이 어떠한 영향을 주는지 살펴보았다. 실크 세리신의 역할을 규명하기 위하여, 실크 세리신을 구성하는 개별 아미노산에 대해서도 금 나노입자의 합성 여부를 확인하였다. 또한 합성된

금 나노입자에 대한 분석을 통하여, 실크 세리신의 캡핑 여부를 확인하고자 하였다. 마지막으로 제조된 금 나노입자의 응용 가능성을 살펴보았다.

제 2 장 문헌 연구

2.1. 생광물화

생광물화(Biomineralization)란 살아있는 유기물이 무기물을 생산하는 과정으로, 이러한 과정에서 생성된 바이오광물들은 생물체 내에서 지지, 방어, 보호 등의 중요한 역할을 한다. 대표적인 예시로는 조개류의 껍질, 동물 뼈, 새의 부리, 규조류 및 해면류의 실리카 또는 박테리아 내부에 축적되는 구리, 철, 금 등이 있다 [13]. 하지만 이렇게 결정화된 무기물들은 주로 유기물과 복합되어 있는 형태로 존재한다. 동물들의 뼈나 뿔, 새의 부리 등은 인산칼슘의 염들과 콜라겐이 복합된 형태로 띠고 있으며, 조개류나 갑각류의 껍질은 탄산칼슘이 키틴 및 단백질과 복합된 형태이다. 특히 전복 껍질의 경우 탄산칼슘 층 사이에 단백질 박막층이 존재하는 형태로 제조된다 [14]. 이들은 상온 조건에서 오직 물만을 이용하여 생산되기 때문에 부산물이나 독성 물질이 없다는 장점을 가진다. 따라서 자연계의 생광물화를 모방하여 인공적으로 하이드록시 아파타이트, 칼슘 카보네이트, 실리카 등을 합성하려는 연구가 진행되고 있다. 한편 누에고치에서도 바이오광물이 발견된 사례가 있다 [4]. 이는 현미경 사진과 X-선 분말 회절 분석을 통하여 옥살산칼슘으로 밝혀졌는데, 옥살산칼슘은 생물의 칼슘 조절, 금속 해독, 가스 확산, 수증기 교환, 온도 조절 등 극한 외부 환경으로부터 보호, 방어 등의 중요한 역할을 한다 [15].

2.1.1. 생광물화의 원리

이러한 생물학적 광물 생성이 일어나는 과정은 크게 결정핵 생성(nucleation)과 결정성장(crystal growth)으로 이루어져있다. 일반적으로 결정핵 생성은 환경 내의 미네랄 이온의 농도가 과포화 상태에 도달하면서 시작된다. 하지만 생물체 내에서는 미네랄 이온의 농도나 pH가 제한적임에도 결정핵 생성이 시작되기도 하는데, 이는 이 과정에서 미네랄 이온과 생체 분자 사이에 어떠한 상호 작용이 존재하기 때문이다 [16]. 또한 이러한 생체 분자의 배향된 구조가 결정 성장에 촉매 역할을 하거나, 결정이 방향성을 갖기 위한 템플릿 역할을 한다. 생체 분자 중 특정한 이차나 삼차 구조를 갖는 단백질은 생광물화에 매트릭스로의 역할을 할 수 있다. 이처럼 원하는 목적에 맞게 생체 분자를 이용하여 결정 성장 인자를 제어하여 다양한 크기와 형태를 갖는 결정을 제조할 수 있다. 최근 이러한 생체모방을 이용하여 보다 정교하고 우수한 물성을 가지는 바이오광물을 합성하려는 시도가 많이 이루어지고 있다 [17].

2.1.2. 실크 세리신을 이용한 생광물화

실크는 실크 피브로인과 실크 세리신 두 가지 단백질로 이루어져 있으며, 실크 세리신은 실크 피브로인 두 가닥을 감싸고 있는 물질로, 실크의 약 25%를 차지한다. 하지만 정련이라는 과정을 통해 매해 약 5만 톤의 실크 세리신이 버려지고 있다. 실크 세리신은 수용성 고분자 단백질이며, 하이드록시기나 카르복시기 등과 같이 강한 극성을 가진 아미노산이 많은 특징이 있다. 특히 세린과 아스파틱산이 각각 약 34 mol% 와 16 mol%를 차지하고 있다 [18]. 이 때 극성 아미노산들의 특정 서열과 수

소결합 등으로 인해 실크 세리신은 aggregated strand, β -sheet, random coil, α -helix, β -turn 등의 다양한 이차 구조를 띠게 된다 [19].

최근에는 실크 세리신의 생체적합성, 생분해성, 항산화성, 우수한 생체 활성 등의 장점을 활용하고자 다양한 분야에 적용하는 연구가 많이 진행되고 있다. 그 중 실크 세리신의 생광물화에 대한 가능성 또한 연구되고 있으며, 특히 실크 세리신의 카르복시기가 칼슘 이온을 결정핵화시켜 하이드록시 아파타이트를 합성할 수 있다는 것이 밝혀졌다 [5]. 이 때, 실크 세리신을 저온에서 숙성시키거나 [20], 칼슘 이온을 첨가해 실크 세리신의 이차 구조를 random coil에서 β -sheet로 변형시킬 수 있다 [7] 이로 인하여 배향된 카르복시기가 하이드록시 아파타이트 결정 성장에 영향을 줄 수 있었다. 또한 실크 세리신의 농도나 반응 시간을 조절하여 하이드록시 아파타이트의 결정 크기를 조절할 수 있었다 [20-22]. 뿐만 아니라 칼슘 카보네이트를 실크 세리신 존재 하에 특정한 구조를 갖는 결정으로 성장시키는데 성공하였으며 [7,23], 실크 세리신의 생광물화 및 생규화 작용을 이용하여 실리카를 합성하기도 하였다 [6].

2.2. 실크 세리신을 이용한 금속 나노입자 합성

실크 세리신은 수용성 생체 고분자이며, 다양한 작용기를 갖는 아미노산으로 이루어져 있기 때문에 금속 이온과 화학적 상호작용을 할 수 있다. 특히 실크 세리신의 아민기, 카르복시기 등에 존재하는 비공유 전자쌍이 금속 이온과 배위결합을 하여 킬레이트화된 금속-세리신 착물 (complexation)을 형성한다 [24]. 이러한 원리를 이용하여 실크 세리신을 생체 흡착제로 사용하여 금속 이온을 제거하려는 연구가 많이 진행되어 왔다 [25-27]. 이때 금속 이온들이 실크 세리신 표면에 흡착될 때 환원

되는 경향이 있었다 [28-30]. Aramwit et al. [31]은 실크 세리신을 환원제와 안정제로 사용하여 은 나노입자를 합성하였다. 이 논문에서는 FT-IR 분석을 통하여 실크 세리신이 알칼리 조건에서 가수분해 되어 생긴 카르복시기가 은 나노입자의 환원에 도움을 주며, 카르복실 음이온과 아미노기가 은 나노입자를 안정화 시키고 침전이나 응집을 막아주는 효과가 있다고 설명하였다. 또한 환원제인 실크 세리신과 전구체인 질산은의 비율을 조절하여 은 나노입자의 합성 효율이나 크기 등을 조절하였다.

2.3. 금 나노입자

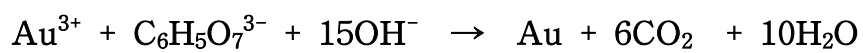
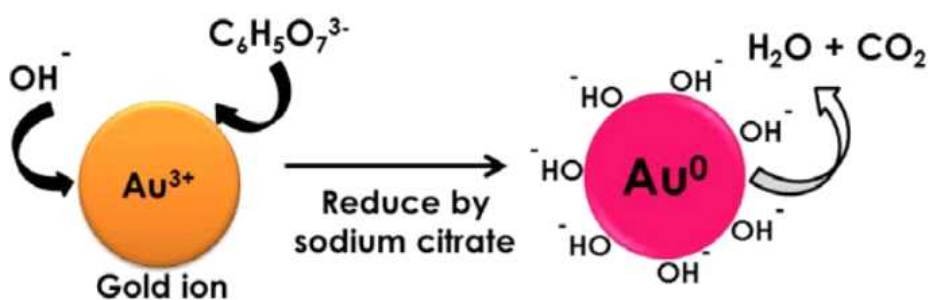
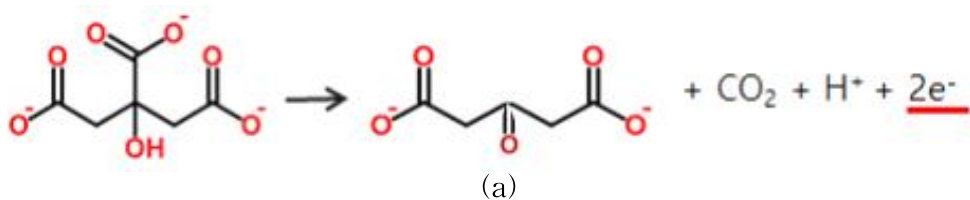
금 나노입자란 입자의 크기가 수에서 수백 나노 정도의 크기를 가지는 극미세 금 입자를 말한다. 콜로이달 골드는 이러한 나노 크기의 금 나노입자가 물과 같은 액체에 분산되어 있는 상태를 말하는데, 이 때 금 나노입자의 크기가 100 nm보다 작으면 붉은 빛을, 그 보다 클 때에는 파랑이나 보라 빛을 띤다. 이 이유는 금 나노입자 표면에 존재하는 자유전자가 입사하는 가시광선과 공진하는 진동을 일으키기 때문이며, 이 현상을 표면 플라즈몬 공명 현상(Surface Plasmon Resonance, SPR)이라고 부른다 [32]. 100 nm보다 작은 금 나노입자의 경우 500 nm 초반 대, 즉 청록색 부분의 파장을 흡수하기 때문에 붉은 빛을 띠며, 입자가 커질수록 공명이 일어나는 파장도 커진다 [33]. 따라서 이러한 현상을 이용하여 UV-Vis 분광광도계를 사용하여 금 나노입자의 유무를 확인할 수 있다. 또한 금 나노입자의 크기가 커질수록 최대흡수 파장대가 레드시프트(Red shift)가 되기 때문에, UV-Vis spectrum을 이용하여 금 나노입자의 크기도 예측할 수 있다 [34].

2.3.1. 금 나노입자의 화학적 합성

금 나노입자를 만드는 방법은 크게 bottom up 방식과 top down 방식으로 나눌 수 있다 [35]. Bottom up 방식은 리소그래피 [11], 화학적 환원, 광화학적 환원 [36], 전기화학적 환원 [11], 템플레이팅 [37], 초음파 환원 [38], 열 환원 [39] 법 등이 있다. 이들은 주로 금 이온의 환원에 의한 결정 생성에 기반한다. Top down 방식은 포토 리소그래피 [40]나 전자 빔 리소그래피 [41]처럼 벌크한 물질로부터 물질을 깎아 나가면서 원하는 구조로 만드는 방법이다. 이 때, Bottom up 방식은 단순분산성이 낮다는 것과 top down 방식은 재료가 낭비된다는 단점이 있다. 하지만 현재는 bottom up 방식이 일반적으로 사용되고 있으며, 특히 화학적 환원법을 이용한 금 나노입자 제조가 주를 이루고 있다.

구형의 금 나노입자를 화학적 환원법으로 제조하는 방법 중 가장 널리 알려진 방법은 1951년 Turkevich에 의해 고안되었다 [9]. 환원제로는 시트르산나트륨, 아미노산, 아스코르브산 등을 사용하였으며, 추가적으로 캡핑/안정제를 사용해 안정화시켜 보관하였다. 입자의 크기는 환원제와 캡핑제의 비율, 반응 pH, 반응 온도 등을 제어하여 조절할 수 있었다. 이 때 금 이온의 환원 원리를 시트르산이 탈카르복실화 반응이 일어나면서 생긴 전자들이 금 이온을 환원시킨다고 설명하였다 (Figure 1) [42].

위 방법들로는 구형의 금 나노입자를 만드는 반면, seeded-growth method [43]로는 로드 [44,45]나 큐브 [46]나 튜브형 [47] 같은 다양한 금 나노구조를 만들 수 있다. 이는 처음에는 수소화 붕소 나트륨 같은 강한 환원제로 금 입자 핵(seed)을 만들고, 추가적인 입자 생성을 억제하고 특정한 결정구조 성장에 도움을 주는 구조 유도체와 약한 환원제인 아스코르브산을 첨가해 특정 모양으로 성장시킨다. 이때에도 핵과 환원제, 구조 유도체의 비율을 조절해 금 나노구조의 크기와 모양을 조절할 수 있다.



(b)

Figure 1. Mechanism of citrate decarboxylation (a) and the reduction of gold ion by sodium citrate (b).

2.3.2. 금 나노입자의 생합성

위의 화학적 환원법에 의한 금 나노입자의 합성은 효율적이긴 하지만 환원제뿐만 아니라 추가적으로 안정제를 첨가해야한다는 것과 추가 표면 개질을 위해 싸이올 기반 안정제로 치환할 때 부산물이 생기거나 유기용매를 사용하여 후 금 나노입자의 생물학적 응용에 제한이 될 수 있다는 단점이 있다. 따라서 유독성 화학물질을 사용하지 않고, 부산물 생성을 최소화하며, 상온·상압에서 합성이 가능한 친환경적 화학 (Green chemistry) 원리를 이용한 금 나노입자의 합성법에 대한 연구가 이루어지고 있다. 이 때 식물 추출물 [48], 탄수화물 [49,50], 단백질 [51-58], 지질 [59], 미생물 [60], 효소 [61], 핵산 [62] 등을 환원제 및 캡핑/안정제로 사용하거나 미생물 내에서 생합성 한다. 이러한 생물 성분들은 자연계에 광범위하게 존재하며, 생산 단가가 낮고, 합성이 쉬우며 환경적으로 안전하다는 장점이 있다. 대부분 문헌에서 이때의 합성 메커니즘을 하이드록실기의 산화로 설명한다 [63].

Huang et al. [64]은 금과 은 나노입자를 합성하는 데 녹나무 잎을 환원제로 사용하였다. FT-IR로 바이오매스의 화학 구조를 분석하여, 다당류와 같은 polyol의 -C-O- 결합에 해당하는 1109cm^{-1} 파장대의 피크가 없어지는 것을 통해 polyol이 금 이온을 환원시키는 역할을 한다고 설명하였다. 또한 녹나무 잎의 금 나노입자 응집을 막는 캡핑제로서의 역할도 규명하였으며, 녹나무 잎의 농도를 이용하여 금 나노입자의 모양과 크기를 조절하였다. 이처럼 저렴하고 풍부한 식물을 이용하면 금 나노입자를 저렴하게 대량 생산할 수 있다는 가능성을 시사하였다.

Huang et al. [65]은 다당류의 한 종류인 키토산을 환원제 및 안정제로 사용하여 금과 은 나노입자를 합성하였다. 이 때 키토산의 아민기가

양 전하를 띠는데, 이것이 골드 클로라이드 음이온 (AuCl_4^-)과 정전기적 인력을 가지며, 키토산이 템플릿 역할을 해 그 안에서 나노입자가 합성된다고 설명하였다. 또한 키토산이나 전구체의 농도로 금 나노입자의 형태학적 구조와 크기를 조절하였다.

Miranda et al. [51]은 HSA(human serum albumin)와 BSA(bovine serum albumin) 단백질을 이용하여 금 나노입자를 합성하였다. pH를 3에서 12까지 조절하였으며, 이 때 pH에 따라 골드 클로라이드 이온의 형태와 단백질의 구조가 다르기 때문에 금 나노입자 합성에 영향을 미친다고 설명하였다. 또한 XRD와 제타전위를 통해서 알부민 단백질이 금 나노입자를 캡핑하고 있는 것을 확인하였다.

Maruyama et al. [66]은 20가지의 아미노산을 환원제와 캡핑제로 사용하여 금 나노입자를 합성했으며, 아미노산과 금 전구체의 농도를 조절하여 금 나노입자의 개별 크기와 응집 정도를 조절하였다.

Konishi et al. [67]은 중온성, 무산소성 박테리아 세포 내에서 금 나노입자를 생합성하였으며, 이는 상온인 25°C 와 pH 7에서 이루어졌다는 데 의의가 있다. 이때, 추가로 첨가해 준 수소 가스가 전자 공여 역할을 하였으며, 주변 세포질의 효소가 환원제로 역할을 하였다고 밝혔다.

Mata et al. [68]은 해조류를 이용하여 금을 환원시켰는데, 특히 다양한 pH 환경에서 금 나노입자의 수율을 계산하였다. 이는 pH가 생물 분자의 가수분해, 복합체 형성, 관능기의 전하, 구조 등과 금의 환원에 영향을 줄 수 있기 때문이라고 밝혔으며, 반응 후에 반응 환경의 pH가 감소하는 경향은 금이 환원되면서 수소 양전하가 방출되기 때문이라고 말했다. 이 실험에서는 해조류의 생활환경인 pH 7에서 가장 많은 금이 환원되었다.

2.3.3. 금 나노입자의 크기와 형태

금 나노입자는 수 나노에서 수백 나노미터의 크기를 가지며, 나노구, 나노케이지 [69], 나노로드 [69], 나노와이어 [70], 나노플레이트 [71], 나노벨트 [72], 나노빔 [72], 나노꽃 [73], 나노별 [74] 등 다양한 구조가 가능하다. 나노입자의 물리화학적 특성은 나노입자의 크기나 모양, 표면 화학이나 응집된 정도에 의해 좌우되기 때문에 크기와 모양을 조절하는 것이 중요하다. 이러한 다양한 크기와 모양은 합성법이나 환원제, 전구체, 안정제의 비율, 반응 pH [75], 온도 [76], 시간, 용매, 첨가제 등을 통해 조절이 가능하다.

Ji et al. [77]은 환원제인 시트르산 나트륨과 전구체인 HAuCl_4 수용액의 비율을 달리하여 pH를 조절하였고, pH 에 따라 전구체인 골드 클로라이드 이온의 형태와 반응성이 달라져 다른 크기의 금 나노입자를 합성할 수 있다고 설명하였다.

Bastus et al. [78]는 시트르산 나트륨과 HAuCl_4 수용액을 끓여 금 입자 핵을 만든 후 90°C 로 식히고, 30분 간격으로 전구체와 환원제를 추가로 넣어주고, 희석시키는 것을 14번 반복하여, 금 나노입자의 크기를 10 nm에서 단계별로 200 nm까지 성장시키는 연구를 진행하였다. 이 실험은 단분산성이 뛰어나고, 크기를 조절 가능하다는 데 의의가 있다. 특정한 형태의 금 나노구조를 만드는 방법은 주로 seeded-growth method로 진행되며, 금 입자 핵을 만들고 두 번째 단계에서 다른 환원제를 첨가해 주거나 형상 템플릿 계면활성제(shape templating surfactant)나 분자를 첨가해 이방성의 결정 구조로 자라게 할 수 있었다 [79].

2.3.4. 금 나노입자의 표면 개질과 바이오컨쥬게이션

대부분 금 나노입자의 합성은 금 이온을 나노입자로 핵화시키는 환원제와 금 나노입자 표면에 흡착 또는 화학적으로 결합하는 안정제가 필요하다. 이러한 안정제는 전하를 띠기 때문에 같은 전하를 띠는 나노입자끼리 분산되어 안정적으로 존재하게 하는 역할을 한다 [80]. 시트르산을 이용한 금 나노입자 합성에서도 시트르산이 금 이온을 핵화시키기 위해 환원제 역할을 함과 동시에 입자에 흡착되고 시트르산의 음전하 때문에 입자들이 콜로이드 상에서 안정화된다. 이러한 안정제들은 리간드 교환반응(ligand exchange reaction)을 통해 또 다른 안정제로 대체될 수 있다. 특히 싸이올기는 금 표면과 친화력이 좋아 표면개질기로 많이 쓰이고 있다 [81]. 이러한 싸이올기반 안정제는 반대편에 카르복시기를 갖고 있기 때문에 음전하를 띠어 안정화 효과를 낼 수 있을 뿐만 아니라 다른 생물분자를 부착하는 역할로도 쓰인다. 이처럼 안정제와 생물분자들의 부착은 바이오컨쥬게이션 반응에 기반한다. 바이오컨쥬게이션이란 두 분자 사이에 안정한 공유결합을 형성하기 위한 반응으로 적어도 하나는 생체 분자일 때를 일컫는다. 이 때 형광 염료 같은 단순하고 비특이적인 사용에서 항체나 약물 같이 복잡한 반응에 이르기 까지 다양한 응용분야에 적용되고 있다.

제 3 장 재 료 및 방 법

3.1. 재 료

실크 세리신 수용액은 농촌진흥청 농업과학기술원에서 제공받은 누에 (*Bombyx mori*) 고치로부터 추출하여 사용하였다. 금 전구체인 Gold (III) chloride solution (HAuCl_4)과 염산 (HCl :37%), 염화나트륨 (NaCl), 모노 나트륨 인산염(NaH_2PO_4), 디소듐포스페이트(Na_2HPO_4), FITC (Fluorescein Isothiocyanate)는 Sigma- Aldrich (USA)에서 구입하였다. 수산화나트륨 (NaOH)과 에탄올 (EtOH)은 삼전화학(주)에서 구입하였다.

3.1.1. 실크 세리신의 추출

누에 고치와 물을 1:25의 용비로 유리병에 담아 고온고압멸균기 (50-ATC-60, 국제싸이엔, Korea)에서 120°C , 60분 동안 열수 추출하였다. 추출한 용액은 부직포로 부유물을 제거한 후, 수분 측정기(Moisture Analyzer) (MB45, OHAUS, US)를 이용하여 초기 실크 세리신의 농도를 측정하였다. 다양한 농도의 실크 세리신 용액은 증류수로 희석하여 준비하였다.

3.2. 방법

3.2.1. 금 나노입자의 합성 조건

3.2.1.1. 실크 세리신의 pH 및 농도

실크 세리신의 pH가 금 나노입자 합성에 미치는 영향을 살펴보기 위하여, 실크 세리신과 전구체인 HAuCl_4 의 최종 농도가 각각 1 mg/ml과 1 mM이 되도록 혼합하여 준 후, 1 M의 NaOH 또는 1 M HCl을 이용하여, pH 2, pH 4, pH 7, pH 9로 조절하였다. 이 용액을 55°C에서 24시간까지 반응을 살펴보았다.

실크 세리신의 농도가 금 나노입자 합성에 미치는 영향을 살펴보기 위하여, HAuCl_4 의 최종 농도는 1 mM로 고정하였으며, 실크 세리신의 최종 농도가 0, 0.2, 0.5, 1, 3, 5 mg/ml이 되도록 혼합하였다. 이 때 반응 용액의 pH는 7로 조절하였으며, 55°C에서 24시간까지 반응을 살펴보았다.

3.2.1.2. 반응 시간 및 반응 온도

반응 시간이 금 나노입자 합성에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 실크 세리신과 HAuCl_4 의 최종 농도가 각각 1 mg/ml과 1 mM이 되도록 혼합하여 준 후, pH 7로 조절한 용액을 55°C에서 48시간, 70°C에서 24시간, 85°C에서 8시간까지 반응을 살펴보았다.

반응 온도의 영향은 실크 세리신과 HAuCl_4 의 최종 농도가 각각 1 mg/ml과 1 mM이 되도록 혼합하여 준 후, pH 7로 조절한 용액을 25, 40, 55, 70, 85°C에서 8시간까지 반응으로 살펴보았다.

3.2.1.3. 실크 세리신의 이차 구조

실크 세리신의 이차 구조 변화가 금 나노입자 합성에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 실크 세리신 수용액에 10:0, 9.5:0.5, 9.0:1.0, 8.5:1.5, 8.0:2.0의 비율로 에탄올을 첨가해 준 후, 실크 세리신과 HAuCl_4 의 최종 농도가 각각 1 mg/ml과 1 mM이 되도록 혼합하였다. 이 용액을 pH 7로 조절하고, 70°C에서 12시간까지 반응을 살펴보았다.

3.2.1.4. 실크 세리신을 구성하는 아미노산

실크 세리신을 구성하는 개별 아미노산이 금 나노입자 합성에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 세린(Ser), 아스파틱산(Asp), 글라이신(Gly), 트레오닌(Thr), 글루탐산(Glu), 알라닌(Ala), 라이신(Lys), 아르기닌(Arg), 발린(Val) 아미노산 수용액을 준비하였다. 개별 아미노산과 HAuCl_4 의 최종 농도가 각각 0.034 M 과 1 mM 이 되도록 혼합하여 준 후 pH 7로 조절한 용액을 70°C에서 30분까지 반응을 살펴보았다.

3.2.2. 금 나노입자의 분석

3.2.2.1. 금 나노입자의 구조 특성

제조된 금 나노입자 콜로이드 용액은 UV-Vis 분광광도계 (UV-Vis spectrometer) (Optizen UV2120, Duksan Mecasys, Korea)를 사용하여 400~800nm 파장 범위에서 측정하였다. 또한 금 나노입자의 형태와 크

기를 관찰하기 위하여, 에너지여과 투과전자현미경 (Energy-Filtering Transmission Electron Microscope, EF-TEM) (LIBRA 120, Carl Zeiss, Germany) 분석을 120 kV의 가속전압으로 수행하였다. 또한 금 나노입자의 크기를 동적광산란계 (Dynamic Light Scattering, DLS) (Zeta-sizer Nano ZS90, Malvern, UK)를 이용해 측정하였다.

한편 금 나노입자 자체를 분석하기 위하여 다음과 같은 방법으로 잔여 실크 세리신을 제거하였다. 먼저 0.5 M NaCl이 첨가된 0.1 M 인산나트륨 완충 용액, 0.1 M 인산나트륨 완충용액, 증류수의 순으로 각각 2회 수세를 실시하였으며, 각 수세 과정에서 금 나노입자는 22,570 RCF에서 15분간 원심분리하여 회수하였다. 이때의 침전물을 건조하여 다양한 분석을 실시하였다. 우선 금 결정구조를 확인하기 위하여 X-선 회절 (X-Ray Diffraction, XRD)은 X-선 분말 회절 분석기(Powder X-Ray Diffractometry) (D8 ADVANCE, BRUKER, German)를 사용하여 수행하였다. 조사조건은 40 kV, 40 mA였으며, XRD 패턴은 2θ 값이 $10\sim 90^\circ$ 의 영역에서 $1^\circ/\text{분}$ 의 속도로 기록되었다. 제조된 금 나노입자의 표면을 분석하기 위해 고분해능 투과전자현미경 (High Resolution - Transmission Electron Microscope, HR-TEM) (JEM-3010, JEOL Ltd, Japan)을 300 kV 가속전압으로 수행하였다. 또한 표면에 존재하는 원소 분석을 위하여 HR-TEM에 연결되어 있는 에너지분산형 분광분석기 (Energy Dispersive Spectroscope, EDS) (Oxford, USA)를 사용하였다. 제조된 금 나노입자에 실크 세리신이 잔존하는지 확인하기 위하여, 열중량분석기(Thermo Gravimetric Analyzer, TGA) (Q-5000IR, TA Instruments, USA)를 사용하였다. TGA 분석 시 잔존하는 수분을 제거하기 위하여 120°C 까지 올린 후, 100°C 로 온도를 떨어트리고 다시 900°C 까지 승온속도 $10^\circ\text{C}/\text{분}$ 으로 실시하였다.

3.2.2.2. 캡핑된 실크 세리신을 활용한 FITC 도입

금 나노입자를 캡핑하는 실크 세리신을 FITC 형광 염료와 바이오컨쥬게이션하기 위하여 위에서 수세한 금 나노입자를 FITC 0.5 mg/ml 수용액과 섞어준 후, 4℃에서 12시간 반응하고, 바이오컨쥬게이션 되지 않은 FITC를 제거하기 위하여 증류수로 22,570 RCF에서 15분간 수차례 원심분리하여 수세하였다. 이를 형광현미경 (Fluorescence Microscope) (DE/Axio Imager A1, Carl Zeiss, Germany)을 통해 관찰하였다.

제 4 장 결과 및 고찰

4.1. 실크 세리신을 이용한 금 나노입자 합성 최적 조건

4.1.1. 실크 세리신의 pH에 따른 영향

실크 세리신은 단백질로 주변 pH에 따라 표면 전하가 달라진다. 일반적으로 단백질의 경우 영전하점(point of zero charge)을 기준으로 그 이하의 pH에서는 양전하 특성(positive charge)을, 그 이상의 pH에서는 음전하 특성(negative charge)을 나타낸다. 따라서 본 실험에서 사용한 실크 세리신 수용액의 제타전위(zeta potential)를 측정하여 pH의 변화에 따른 실크 세리신의 표면 전하 특성을 살펴보았다. 산성 조건인 pH 2에서는 실크 세리신 수용액의 제타전위가 +16.9 mV, 세리신의 등전점으로 알려진 pH 4에서는 +1.66 mV, 중성 조건인 pH 7에서는 -21.2 mV, 그리고 염기성 조건인 pH 9에서는 -24.7 mV로 나타났다 (Figure 2). 이를 통해 pH 2에서는 실크 세리신에 존재하는 아미노기는 $-NH_3^+$ 로, 카르복시기는 $-COOH$ 로 존재하며, pH 4에서는 $-NH_3^+$ 와 $-COO^-$ 가 균형을 이루고, 중성 이상의 pH에서는 $-NH_3^+$ 보다 $-COO^-$ 가 우세하여 전체적으로 음전하를 띤다고 볼 수 있다.

이와 같이 실크 세리신은 주변의 pH에 따라 전하 특성이 바뀌므로, 실크 세리신을 이용한 금 나노입자 합성에 반응 pH가 중요하게 작용할 것으로 판단되어 우선적으로 금 나노입자 합성 최적 pH 조건을 찾기로 하였다. 실크 세리신 수용액과 $HAuCl_4$ 의 최종 농도가 각각 1 mg/ml과

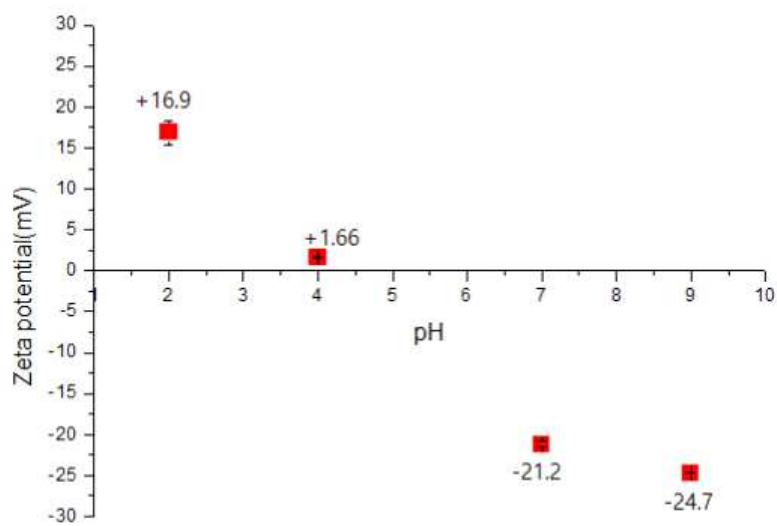


Figure 2. Zeta potential of silk sericin (SS) solution (1 mg/ml) at pH 2, 4, 7 and 9.

1 mM 이 되도록 혼합한 후, 혼합액의 pH를 각각 2, 4, 7, 9로 조절하고, 55°C에서 24 시간까지 반응을 관찰하였다 (Figure 3). pH 2의 조건에서 합성한 경우 금색의 입자가 침전되는 것이 관찰되었지만, 상등액은 투명한 상태를 나타내었다. pH 4의 조건에서는 실크 세리신의 응집이 관찰되었고, 상등액은 보라색이었으나 상당량의 침전물이 발생하였다. pH 7의 조건에서는 전형적인 붉은 빛의 금 나노입자 콜로이드 용액을 얻을 수 있었으며, pH 9에서는 색의 농도가 옅어졌다. 각 pH 조건에서 금 나노입자 특유의 SPR 흡광 피크가 나타는지 확인하기 위하여, UV-Vis 분광 광도계에서 흡광도를 측정하였다. 침전물이 발생한 경우 침전물을 제외한 상등액을 측정하였다. Figure 4에서 보듯이 pH 2의 조건에서는 상등액에서 SPR 흡광 피크가 나타나지 않았으나, pH 7과 pH 9의 용액에서 525 nm에서는 전형적인 금 나노입자의 SPR 피크가 나타났다. 한편 pH 4의 조건에서는 SPR 피크가 535 nm로 레드 시프트되었으며, 700 nm에서 추가적인 피크가 나타났다. 이는 금 나노구조가 나노로드나 삼각형 모양처럼 이방성 나노 입자인 경우 두 개의 축을 따라 전자 진동이 일어나기 때문에 두 개의 SPR 피크가 나타나는 것이다 [35].

각 pH 조건에서 합성된 금 입자의 형태와 크기를 에너지여과 투과전자현미경으로 살펴보았다 (Figure 5). pH 2의 조건에서 합성한 경우 투명한 상등액에는 아무것도 관찰되지 않았으나 금색의 침전물을 분석할 결과 2-3 μm 크기의 삼각형 또는 육각형의 마이크로플레이트를 관찰할 수 있었다. pH 4의 조건에서는 금 나노입자끼리 뭉쳐있거나, 삼각형 모양의 금 나노입자를 확인할 수 있었다. 이는 앞선 SPR 피크 분석에서 두 개의 피크가 나타난 결과를 뒷받침한다. 한편 pH 7의 조건에서는 가장 많고 균일한 크기의 금 나노입자를 확인할 수 있었으며, pH 9의 조건에서는 금 나노입자가 많이 관찰되지 않았다. SPR 피크 분석에서 흡

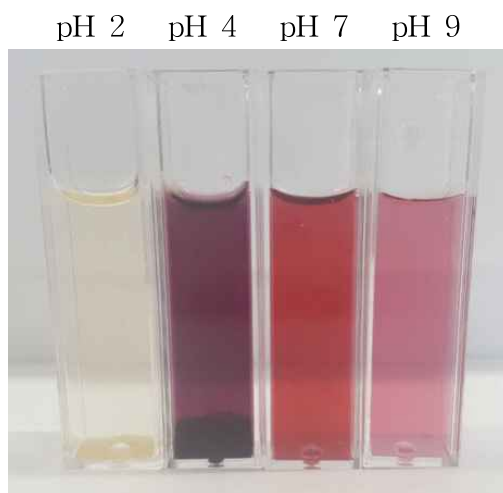


Figure 3. Optical images of gold colloids prepared at different pH. From left to right, the pH of medium was 2, 4, 7 and 9. For each reaction, the initial concentrations of SS and HAuCl_4 were 1 mg/ml and 1 mM, respectively. The reaction was carried out for 24 hours at 55°C .

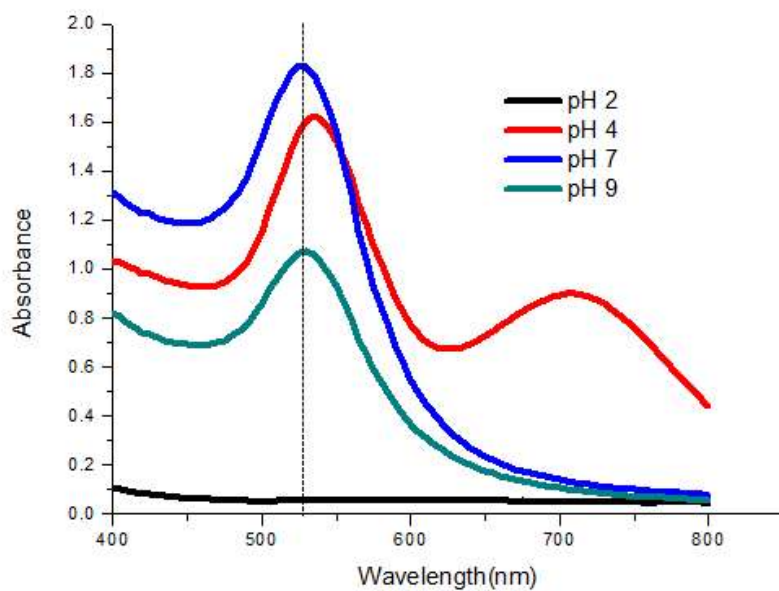


Figure 4. UV-Vis spectra of gold colloids prepared at different pH. For each reaction, the initial concentrations of SS and HAuCl_4 were 1 mg/ml and 1 mM, respectively. The reaction was carried out for 24 hours at 55°C .

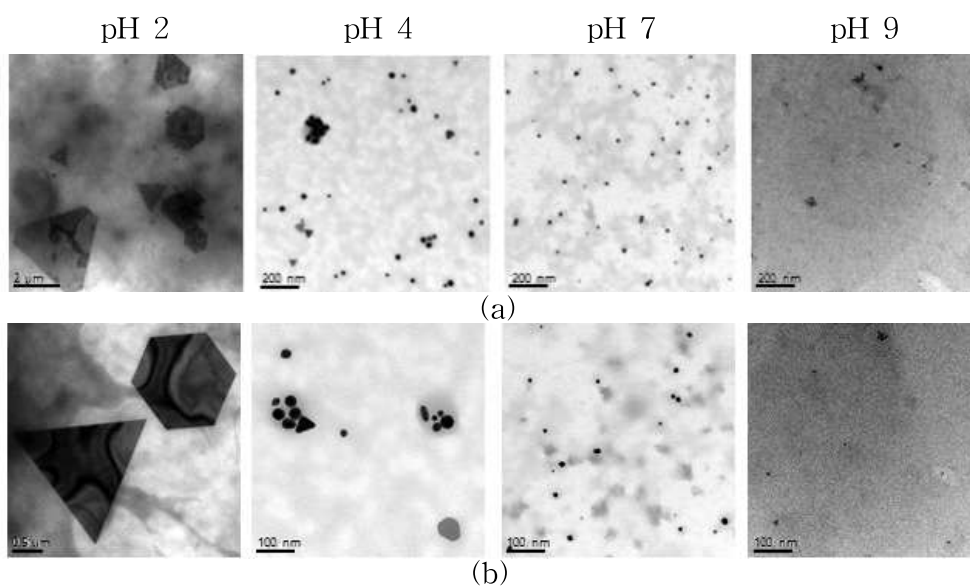


Figure 5. EF-TEM images of precipitates (pH 2) and gold nanoparticles (AuNPs) in the colloids (pH 4, 7 and 9): (a) low magnification and (b) high magnification. For each reaction, the initial concentrations of SS and HAuCl_4 were 1 mg/ml and 1 mM, respectively. The reaction was carried out for 24 hours at 55°C .

광도는 금 나노입자의 농도에 비례한다. 앞선 실험에서 pH 7의 조건에서 제조된 용액의 흡광도가 pH 9의 경우보다 높았으므로 보다 많은 금 나노입자가 pH 7에서 합성되었음을 알 수 있으며, 이는 EF-TEM 관찰에서도 확인되었다.

이와 같이 각 pH 조건에 따른 금 나노입자의 크기와 형태의 차이는 실크 세리신과 금 이온의 상호작용에 의해서 결정된다고 할 수 있다. pH 2의 경우에는 AuCl_4^- 의 환원이 가장 잘 일어나는 조건이며 동시에 양전하를 갖는 실크 세리신과 AuCl_4^- 간의 정전기적 인력도 최대이다. 따라서 실크 세리신과 AuCl_4^- 이 일종의 클러스터를 형성하고 그 내부에서 금 이온의 환원이 일어나 다른 pH보다 큰 입자로 결정이 성장하여 석출된 것으로 보인다. 또한 실크 세리신의 카르복시기도 $-\text{COOH}$ 의 형태를 띠기 때문에 정전기적 반발력을 내지 못해 금 입자가 분산되지 않고 계속 환원이 진행되어서 수 마이크로 크기의 삼각형 또는 플레이트로 성장한 것으로 생각된다. 또한 pH 4의 조건에서는 실크 세리신의 등전점이기 때문에 시간이 지나면서 실크 세리신이 응집되는 경향을 보였으며, 이 때문에 금 이온과 효율적으로 반응하지 못하는 것으로 예상하였다. 한편 pH 7의 조건에서는 금 이온을 환원시킬 것으로 기대되는 실크 세리신의 하이드록실기, 아미노기, 카르복시기가 가장 반응성이 좋은 환경이기도 하며 [68], 금 나노입자의 표면을 감싸는 실크 세리신이 음전하를 나타내므로 정전기적 반발력에 의하여 금 나노 입자가 잘 분산되는 것으로 예상하였다. pH 9의 조건에서는 AuCl_4^- 과 실크 세리신의 반발력이 커서 AuCl_4^- 의 환원 반응이 적게 일어난 것으로 예상하였다. 따라서 pH 7의 조건에서 가장 효율적으로 금 나노입자를 합성할 수 있었기 때문에 향후 실험에서는 pH 7로 조건을 고정하고 진행하였다.

4.1.2. 실크 세리신의 농도에 따른 영향

전구체인 HAuCl_4 수용액과 실크 세리신의 비율이 금 나노입자의 합성 여부 및 크기에 영향을 미칠 것으로 기대하고, 실크 세리신의 최종 농도를 0, 0.2, 0.5, 1, 3, 5 mg/ml가 되도록 혼합하고, pH 7, 55°C에서 24시간까지의 반응을 관찰하였다. 이때, 전구체인 HAuCl_4 수용액의 최종 농도는 1 mM 로 고정하여 진행하였다.

Figure 6에서 알 수 있듯이 실크 세리신을 전혀 넣지 않았을 때에는 24시간 후에도 금 나노입자가 전혀 생성되지 않은 것을 통해 실크 세리신의 환원제로서의 역할을 확인할 수 있었다. 저농도인 0.2와 0.5 mg/ml의 실크 세리신 수용액을 사용한 경우에는 용액이 검은색으로 변하였다. 기존의 연구에 의하면 50~100 nm 정도 크기의 금 나노입자 콜로이드 용액의 경우 이러한 검은색을 나타낸다고 보고하였다 [34]. 또한 1 mg/ml 실크 세리신 수용액을 사용하였을 때 그 보다 더 고농도인 3 또는 5 mg/ml 실크 세리신 수용액보다 더 빠르게 색이 변화하는 것을 확인하였다. 이는 실크 세리신이 고농도일 때에는 금 이온과 이멀전이 제대로 이루어지지 않고, 오히려 실크 세리신간의 상호작용이 강하게 일어나 금 나노입자 합성이 잘 일어나지 않는 것으로 생각된다. 실제로 실크 세리신은 분자간 수소결합에 의하여 젤이 형성되는 특성을 갖고 있는데 이는 특히 실크 세리신의 농도에 비례한다.

24시간 반응한 금 나노입자 콜로이드 용액을 UV-Vis 분광 광도계를 통해 분석하였다 (Figure 7). 0.2, 0.5, 1, 3 mg/ml 실크 세리신 수용액에서 SPR 피크가 나타났다. 그러나 0과 5 mg/ml 실크 세리신 수용액을 사용한 경우에는 SPR 피크가 나타나지 않았다. 최대 흡광도는 1 mg/ml 실크 세리신 수용액에서 나타났으며 이는 육안 관찰과 일치한다.

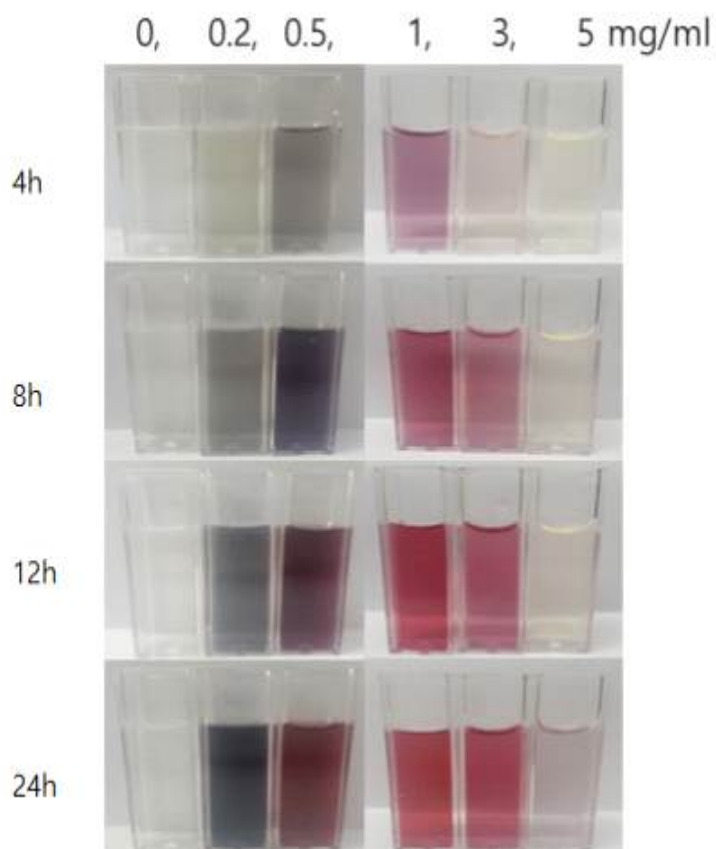


Figure 6. Optical images of gold colloids prepared at different concentrations of SS. The initial concentration of HAuCl_4 was 1 mM, and the reaction was carried out up to 24 hours at pH 7 and 55°C .

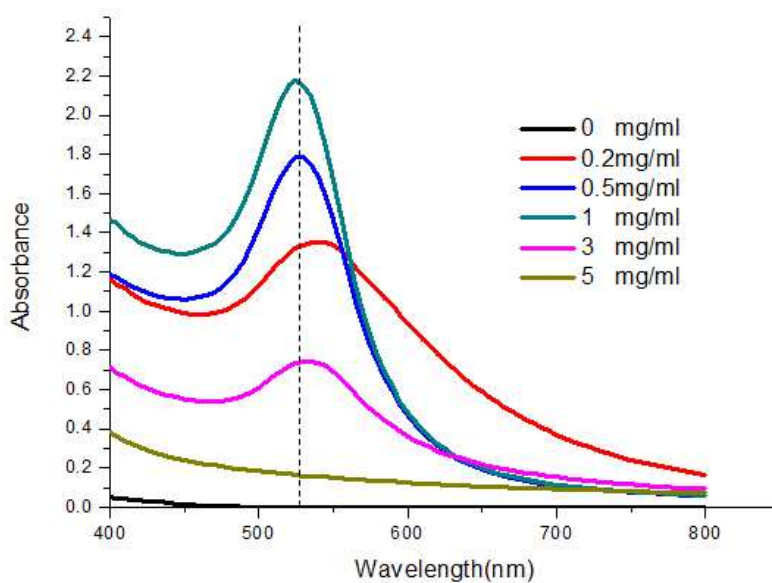


Figure 7. UV-Vis spectra of gold colloids prepared at different concentrations of SS. The initial concentration of HAuCl_4 was 1 mM, and the reaction was carried out for 24 hours at pH 7 and 55°C .

한편 0.2 mg/ml 실크 세리신 수용액을 사용한 경우에는 SPR 피크가 레드 시프트가 되었으며, 이는 금 나노입자의 크기가 증가하였음을 나타낸 것이다. 따라서 1 mg/ml 실크 세리신 수용액에서 가장 효율적으로 금 나노입자가 합성되는 것을 알 수 있었다.

위의 조건에서 제조된 금 나노입자를 EF-TEM을 통하여 관찰하였다 (Figure 8). 그 결과 저농도인 0.2 mg/ml 실크 세리신 수용액을 사용하였을 때에는 저배율에서 약 50 nm의 금 나노입자가 형성된 것으로 판단되었으며 이는 앞에서 용액의 검은색으로 변하는 것과 SPR 피크가 레드 시프트된 결과와 일치한다. 그러나 고배율로 확대한 결과 보다 작은 입자가 응집되어 크기가 크게 측정된 것으로 확인하였다. 0.5 mg/ml 실크 세리신 수용액을 사용한 경우에도 금 나노입자들이 모여있는 것을 관찰할 수 있었는데, 이를 통해 실크 세리신이 저농도일 때에는 금 나노입자를 충분히 캡핑하지 못하여 금 나노입자끼리 응집하는 경향이 있다고 판단하였다. 1과 3 mg/ml 실크 세리신 수용액을 사용한 경우에는 금 나노입자의 응집이 관찰되지 않았다. 5 mg/ml 실크 세리신 수용액을 사용한 경우에는 금 나노입자를 관찰할 수 없었다.

EF-TEM 사진을 기반으로 금 나노입자의 크기를 측정하였다 (Figure 9). 0.2 mg/ml 실크 세리신 수용액을 사용하였을 때에는 금 나노입자가 응집되어 개별 입자의 크기를 측정하기는 어려웠다. 따라서 응집된 입자의 크기를 측정한 결과 47.5 ± 9.33 nm였다. 0.5, 1, 3 mg/ml 실크 세리신 수용액을 사용한 경우에는 개별 금 나노입자의 크기를 측정할 수 있었으며, 농도가 높아질수록 크기가 작아지는 것을 확인하였다. 이는 전구체에 비해 캡핑/안정제의 비율이 높을수록 금 나노입자 크기 성장을 방해하기 때문으로 예상하였다.

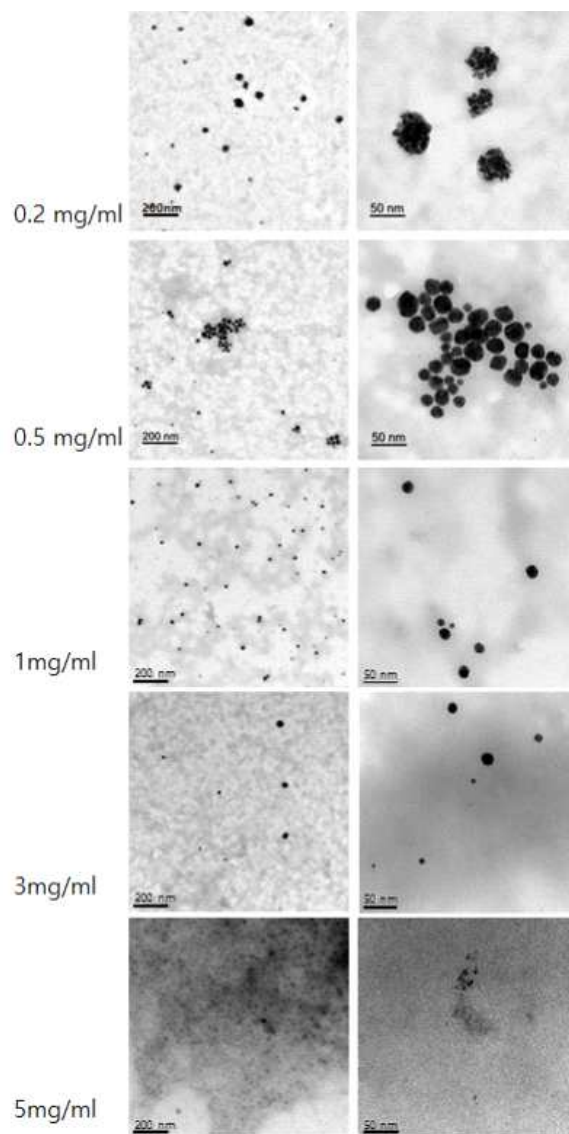


Figure 8. EF-TEM images of AuNPs in colloids prepared at different concentrations of SS. The initial concentration of HAuCl_4 was 1 mM, and the reaction was carried out for 24 hours at pH 7 and 55°C : (left) low magnification and (right) high magnification.

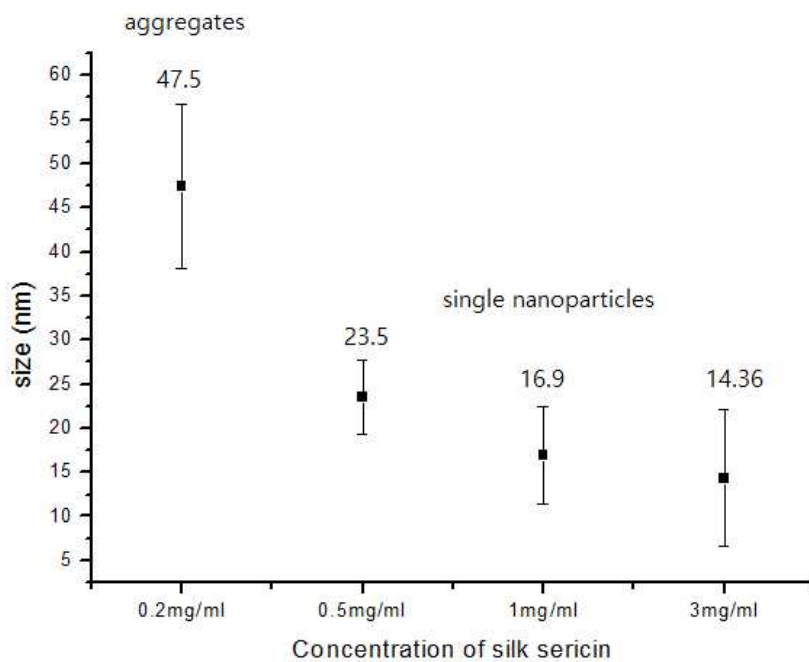


Figure 9. Size distribution of the AuNPs prepared at different concentrations of SS. The initial concentration of HAuCl_4 was 1 mM, and the reaction was carried out for 24 hours at pH 7 and 55°C . Error bar indicates standard deviation.

위 결과들을 통해서 실크 세리신의 농도가 1 mg/ml 금 나노입자가 응집하지 않고, 가장 많이 만들어진다고 판단하여 향후 실험에서는 실크 세리신의 농도를 1 mg/ml 로 고정하여 진행하였다.

4.1.3. 반응 시간에 따른 영향

반응 시간이 금 나노입자 합성에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 실크 세리신과 HAuCl_4 의 최종 농도를 각각 1 mg/ml과 1 mM로 혼합하고, pH 7로 조절하였다. 이 후 55℃에서 48시간, 70℃에서 24시간, 85℃에서 8시간까지 반응을 관찰하였다. Figure 10에서 보듯이 반응 시간이 길어질수록 생성되는 금 나노입자의 양은 증가하였으나 최대 흡광도가 나타나는 파장이 변하지 않는 것으로 보아 반응 시간에 따라 금 나노입자의 크기의 증가는 일어나지 않았다. 또한 온도가 증가할수록 보다 빠른 시간에 금 나노입자가 합성되는 것을 확인할 수 있었다. 반면 시간이 지남에 따라 UV-Vis 분광광도계 흡광도 피크의 폭이 좁아지는 것을 보아 단분산성이 좋아지는 것으로 예상하였다.

4.1.4. 반응 온도에 따른 영향

앞선 실험에서 반응 온도가 높을수록 생성되는 금 나노입자의 양이 달라지는 것을 확인했다. 따라서 반응 온도가 금 나노입자 합성에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 25, 40, 55, 70, 85℃에서 8시간까지 반응을 살펴보았다. 우선 상온인 25℃와 40℃에서는 8시간까지 육안 상 붉은 빛으로 변하지 않았으며, 55℃에서 85℃로 갈수록 더 짙은 붉은 빛을 나타내

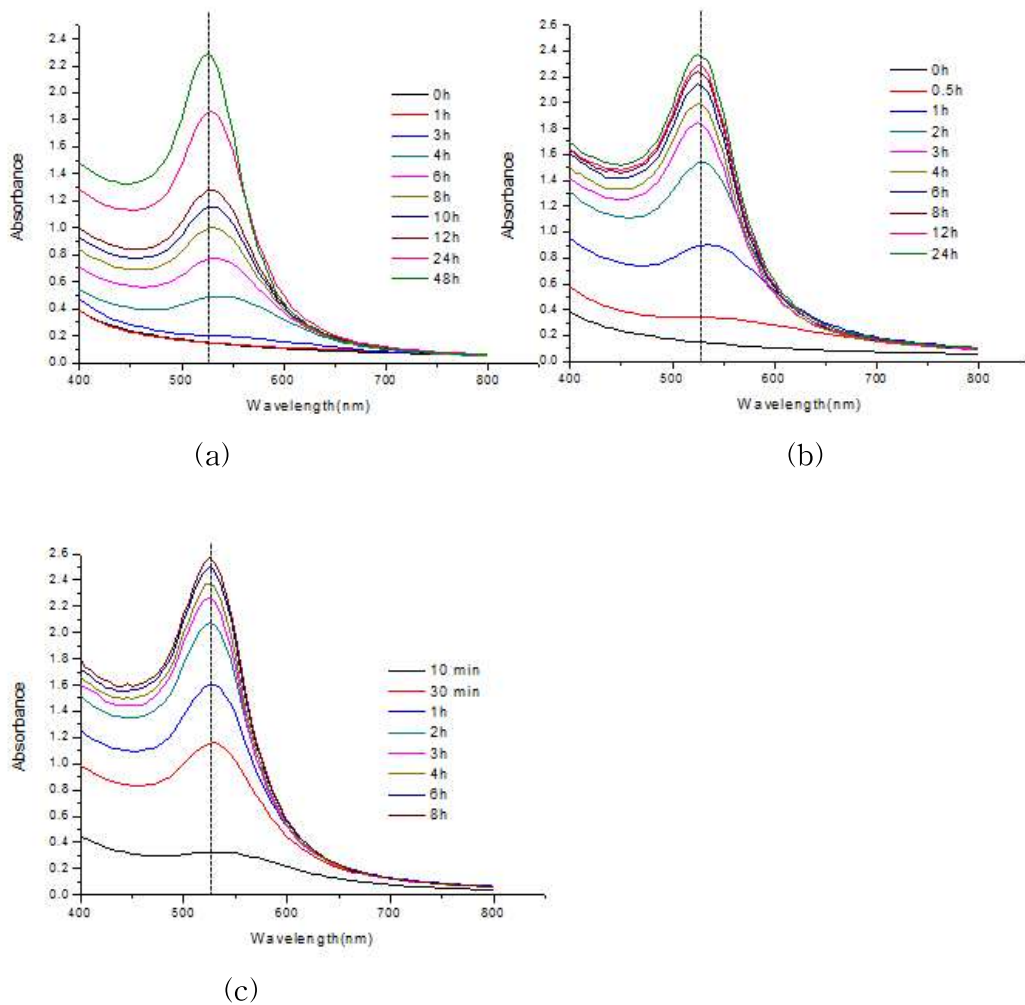


Figure 10. UV-Vis spectra of gold colloids recorded with designated time interval at different reaction temperature conditions. For each reaction, the initial concentrations of SS and HAuCl_4 were 1 mg/ml and 1 mM, respectively. The pH was adjusted at 7: (a) 55°C, (b) 70°C, and (c) 85°C.

었다 (Figure 11). Figure 12에서는 최대 흡광도가 나타나는 525 nm에서 흡광도를 온도와 시간에 따라 나타내었는데, 고온으로 갈수록 금 나노입자 초기 합성 속도가 빠른 것을 알 수 있었다. 8시간 반응한 금 나노입자 콜로이드 용액을 대상으로 EF-TEM 분석을 실시하였다 (Figure 13). EF-TEM 저배율의 이미지에서 보다시피 온도가 높을수록 더 많은 입자가 들어진 것을 알 수 있었다. 반면 EF-TEM 고배율 이미지를 통해, 25°C에서 반응한 금 나노입자 콜로이드 용액에 경우, 아주 작은 금 나노입자가 존재하는 것을 알 수 있었다. 또한 55°C 이상에서는 다양한 크기의 금 나노입자를 확인할 수 있었다. 이러한 금 나노입자의 크기 분포를 확인해본 결과, 25°C에서는 약 3 nm의 금 결정핵이 주로 존재하였으며, 온도가 증가할수록 17 nm까지 금 나노입자의 크기가 커지는 것을 확인하였다 (Figure 14 (a)). 85°C에서는 70°C에 비하여 크기는 더 커지진 않았지만, 다른 온도에 비해 더 불균일한 금 나노입자를 얻을 수 있었다. DLS 분석을 통해서도 EF-TEM 이미지에 상응하는 비슷한 양상의 크기 분포를 얻을 수 있었다 (Figure 14(b)).

실험 결과를 통해 반응 온도를 조절함으로써 반응 효율을 높일 수 있었다. 그러나 85°C에 경우 70°C와 입자의 크기에 큰 차이가 없었으며, 오히려 단분산성이 떨어지므로, 최적 합성 조건을 70°C로 정하여 이 후 실험을 진행하였다.

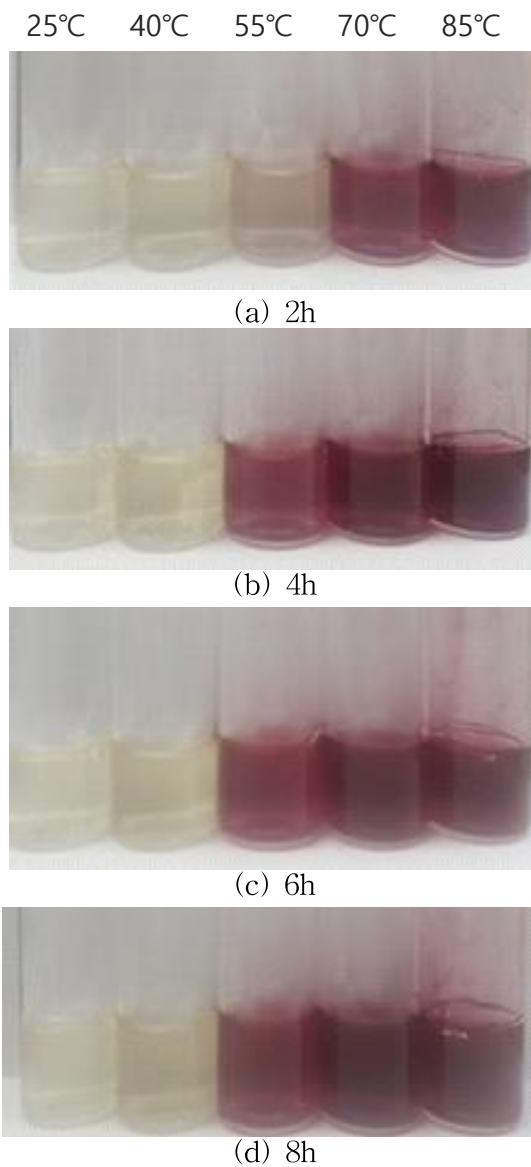


Figure 11. Optical images of gold colloids prepared at different reaction times and temperatures: (a) 2, (b) 4, (c) 6 and (d) 8 hours. For each reaction, the initial concentrations of SS and HAuCl_4 were 1 mg/ml and 1 mM, respectively. The pH was adjusted at 7.

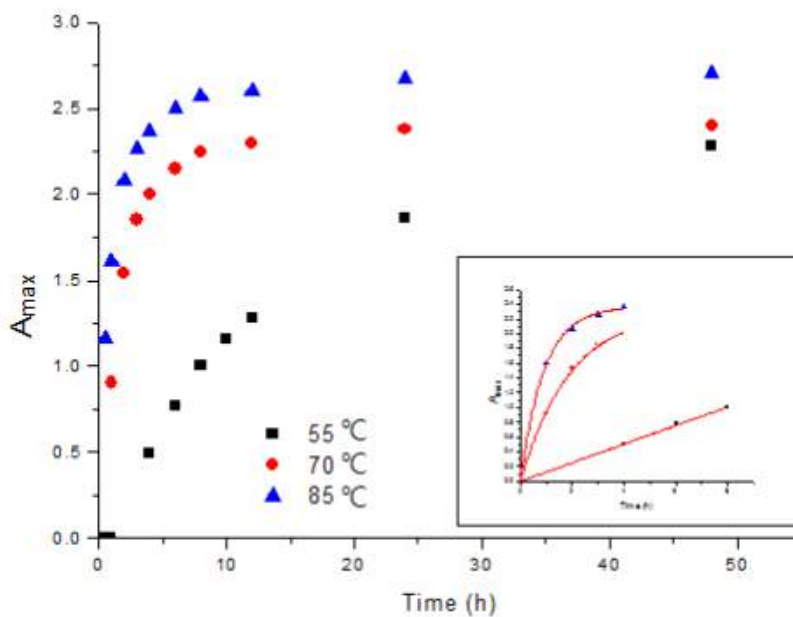


Figure 12. The increase of maximum absorbances in UV-Vis spectra of gold colloids up to 48 hours at different reaction temperature. For each reaction, the initial concentrations of SS and HAuCl_4 were 1 mg/ml and 1 mM, respectively. The pH was adjusted at 7. The inset figure shows the results of first 8 hours.

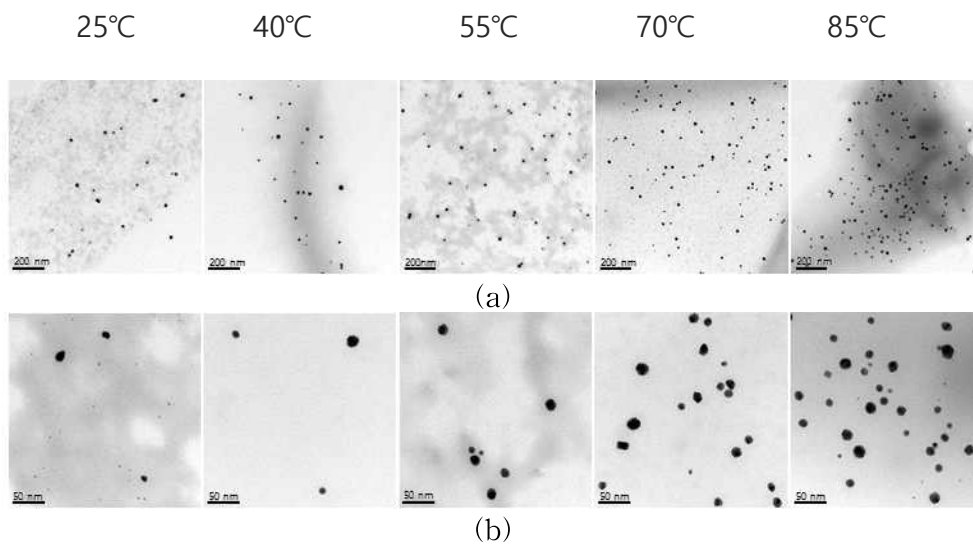
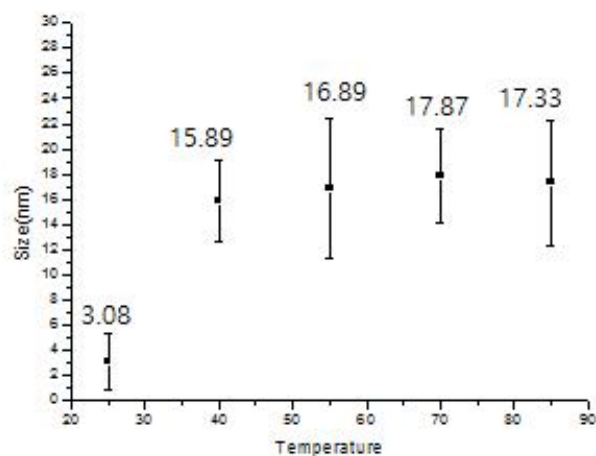
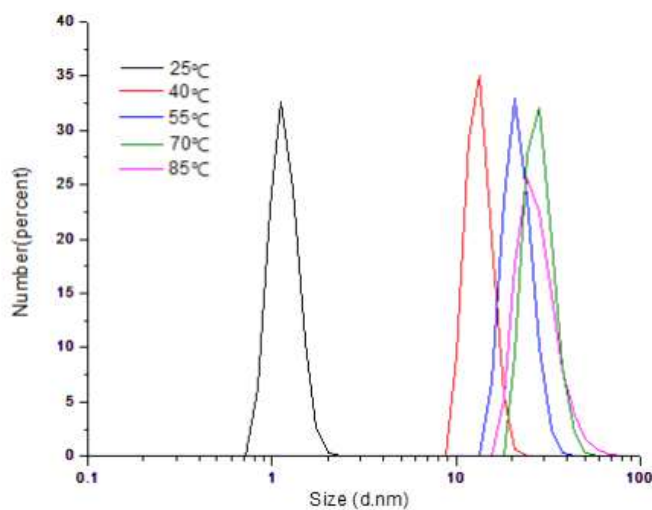


Figure 13. EF-TEM images of AuNPs in colloids prepared at different reaction temperatures for 8 hours: (a) low magnification and (b) high magnification. For each reaction, the initial concentrations of SS and HAuCl₄ were 1 mg/ml and 1 mM, respectively. The pH was adjusted at 7.



(a)



(b)

Figure 14. Size distribution of AuNPs prepared at different reaction temperatures for 8 hours. The size data were obtained from EF-TEM image analysis (a) and DLS measurement (b). For each reaction, the initial concentrations of SS and HAuCl₄ were 1 mg/ml and 1 mM, respectively. The pH was adjusted at 7. Error bar indicates standard deviation.

4.1.5. 트립신 및 BSA를 이용한 금 나노입자 합성

세리신 이외에도 트립신이나 BSA와 같은 단백질을 금 나노입자의 합성에 이용한 사례가 있다 [73,51]. 앞서 설정한 실크 세리신의 최적 조건을 기준으로 실크 세리신 대신 트립신과 BSA를 이용하여 금 나노입자의 합성을 시도하였다. Figure 15에서 알 수 있듯이 트립신을 환원제 및 캡핑제로 사용한 금 나노입자 합성에서는 저농도의 실크 세리신을 사용한 것처럼 어두운 빛의 금 나노입자 콜로이드 용액이 만들어졌다. BSA 단백질을 사용한 경우 pH 4의 실크 세리신 실험에서와 같이 단백질이 응집되어 침전하는 경향을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 단순히 단백질에 존재하는 아미노산 잔기에 의한 환원 효과뿐만 아니라 각 단백질의 반응 pH에 따른 고유한 전하 특성이나 특정한 이차 또는 삼차 구조가 금 나노입자의 합성에 영향을 준다고 생각할 수 있다. 따라서 실크 세리신의 이차 구조가 금 나노입자 합성에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.



Figure 15. Optical images of gold colloids prepared with trypsin and BSA. For each reaction, the initial concentrations of trypsin and BSA were 1 mg/ml, respectively. The reaction was carried out at pH 7 and 70°C for 12 hours.

4.1.6. 실크 세리신 이차 구조 변화에 따른 영향

실크 세리신은 각 단백질 분자들이 규칙성이 없는 무질서한 구조이다. 이전에 실크 세리신을 이용한 실리카의 합성에서 실크 세리신의 이차 구조가 생규화에 영향을 준다는 것이 보고된 바 있다 [18]. 실크 세리신의 이차 구조는 알코올을 첨가함으로써 β -sheet로 유도할 수 있다. Oh et al. [82]는 실크 세리신을 에탄올로 처리하였을 때 실크 세리신의 이차 구조가 random에서 aggregated strand 또는 β -sheet 구조로 변한다고 설명하였다.

실크 세리신의 이러한 이차 구조의 변화가 금 나노입자 합성에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 실크 세리신 수용액에 10:0, 9.5:0.5, 9.0:1.0, 8.5:1.5, 8.0:2.0의 비율로 에탄올을 첨가해 준 후, 실크 세리신과 HAuCl_4 의 최종 농도가 각각 1 mg/ml와 1 mM이 되도록 혼합하였다. 이 용액을 pH 7로 조절하고, 70°C에서 12시간까지 반응을 관찰하였다.

Figure 16에서 육안 상으로 에탄올 함량이 더 높을수록 더 빨리 금 나노입자 콜로이드 용액의 색이 붉은 빛을 띠는 것을 확인하였다. 기존의 문헌에서는 실크 세리신이 β -sheet 구조로 전이되면서 무기 이온을 환원시키는 하이드록실기나 카르복시기가 정렬되어 때문에 더 많은 무기 입자가 생성된다고 설명하였다 [7,20]. 따라서 본 연구에서도 실크 세리신의 이차 구조가 β -sheet 구조로 유도됨에 따라 환원력을 갖는 아미노산의 곁사슬이 금 이온과 접촉할 확률이 증가하게 되고 이에 따라 더 많은 금 나노입자가 생성된 것으로 예상할 수 있다. 12시간 반응시킨 용액을 UV-Vis 분광광도계로 살펴본 결과 실크 세리신이 β -sheet 구조로 변함에 따라 더 많은 금 나노입자가 생성되어 높은 흡광도를 가졌다. 한편 에탄올 함량이 높을수록 최대 흡광도의 파장대가 약간 레드 시프트

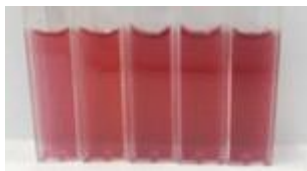
10:0,9.5:0.5,9.0:1.0,8.5:1.5,8.0:2.0



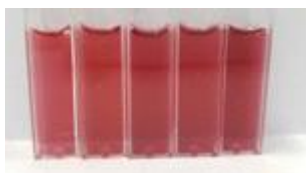
(a) 1 h



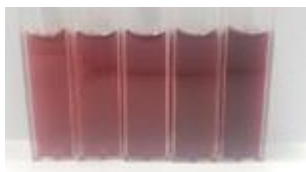
(b) 2 h



(c) 4 h



(d) 8 h



(e) 12 h

Figure 16. Optical images of gold colloids prepared with different SS:ethanol compositions. From left to right, the SS:ethanol compositions (v/v) were 10:0, 9.5:0.5, 9.0:1.0, 8.5:1.5, and 8.0:2.0. For each reaction, the initial concentrations of SS and HAuCl_4 were 1 mg/ml and 1 mM, respectively. The reaction was carried out at pH 7 and 70°C for 12 hours.

되었다 (Figure 17). 따라서 합성된 금 나노입자의 크기에 변화가 있을 것으로 기대하고 EF-TEM 분석을 실시하였다. Figure 18에서 보다시피 에탄올 함량이 높을수록 더 많은 입자가 만들어졌으며, 입자의 크기도 증가하는 것이 관찰되었다. 에탄올이 전혀 들어가지 않은 경우 17.9 ± 3.7 nm였던 금 나노입자가 에탄올 함량이 늘어남에 따라 크기가 증가하였으며, 에탄올이 실크 세리신 수용액에 최대 20% 함유되었을 때 금 나노입자가 20.2 ± 3.83 nm 까지 커지는 것을 알 수 있었다 (Figure 19). 따라서 실크 세리신이 에탄올에 의해서 β -sheet 구조로 전이되면서 하이드록실기나 카르복시기가 정렬되어 더 많은 금 나노입자를 제조할 수 있었을 뿐만 아니라 금 나노입자의 크기도 커지는 것을 알 수 있었다.

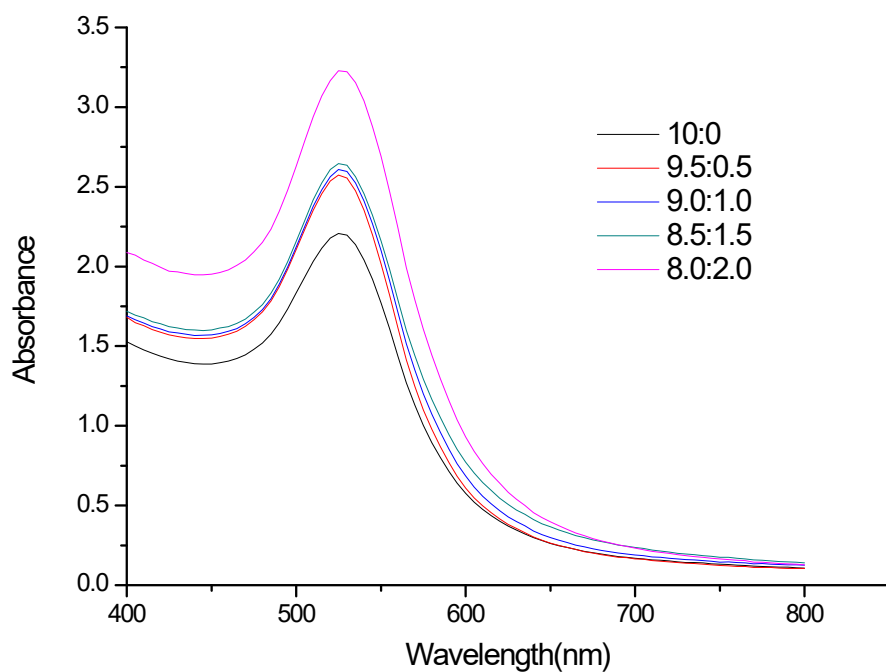


Figure 17. UV-Vis spectra of gold colloids prepared with different SS:ethanol compositions. For each reaction, the initial concentrations of SS and HAuCl_4 were 1 mg/ml and 1 mM, respectively. The reaction was carried out at pH 7 and 70°C for 12 hours.

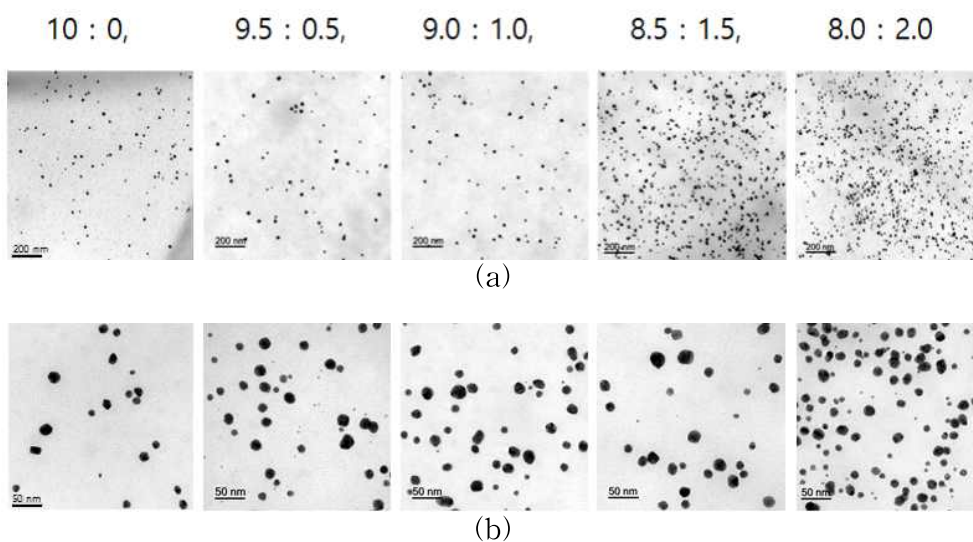


Figure 18. EF-TEM images of AuNPs in gold colloids prepared with different SS:ethanol compositions: (a) low magnification and (b) high magnification. For each reaction, the initial concentrations of SS and HAuCl_4 were 1 mg/ml and 1 mM, respectively. The reaction was carried out at pH 7 and 70°C for 12 hours.

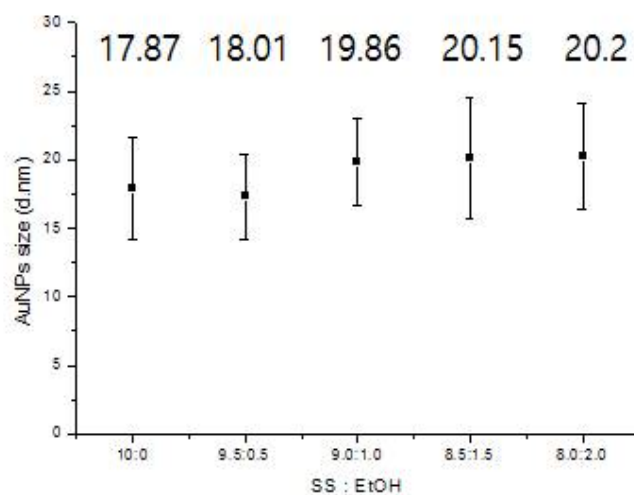


Figure 19. Size distribution of AuNPs prepared with different SS:ethanol compositions. For each reaction, the initial concentrations of SS and HAuCl₄ were 1 mg/ml and 1 mM, respectively. The reaction was carried out at pH 7 and 70°C for 12 hours. Error bar indicates standard deviation.

4.2. 실크 세리신을 이용해 합성한 금 나노입자의 구조 특성

앞선 실험 결과들을 통하여 실크 세리신을 이용하여 금 나노입자를 합성하는 최적 조건은 HAuCl_4 의 농도가 1 mM인 경우 실크 세리신의 농도는 1 mg/ml, 반응 pH는 7, 반응 온도는 70°C 에서 12시간 반응임을 확인하였다. 이러한 환경에서 합성된 금 나노입자의 금 결정구조를 확인하기 위하여 X-선 회절분석을 실시하였다 (Figure 20). 이 때, $2\theta = 38, 45, 64$ 및 77° 에서 피크가 나타났으며, 이는 각각 (111), (200), (220) 및 (311)의 브래그 반사(Bragg reflection)에 해당한다. 또한 XRD 패턴을 JCPDS 표준 (Joint Committee on Powder Diffraction Standards)과 비교하였을 때, 면심 입방 구조(FCC)를 지닌 금 나노입자임을 확인하였다 [48, 64]. 한편 에너지분산형 분광분석(EDS)에서는 금 원소뿐만 아니라 질소 원소를 확인할 수 있었는데 (Figure 21), 이를 통하여 금 나노입자에 환원제인 실크 세리신 단백질이 남아져있다고 생각되어 추가 분석을 실시하였다.

기존 금 나노입자와 비교하기 위하여 Turkevich 방법으로 금 나노입자를 합성하였다. 시트르산나트륨으로 합성한 금 나노입자와 실크 세리신으로 합성한 금 나노입자를 열중량분석기(TGA)를 통해 분석해본 결과 (Figure 22), Turkevich 방법으로 제조된 금 나노입자의 경우 900°C 도에서도 뚜렷한 무게감소가 없는 반면, 실크 세리신으로 합성한 금 나노입자는 250°C 부터 급격한 무게 감소를 나타내었다. 250°C 에서의 급격한 무게 감소는 실크 세리신의 열분해 온도와 일치함을 확인함으로써 실크 세리신이 금 나노입자와 함께 존재한다는 것을 확인하였다.

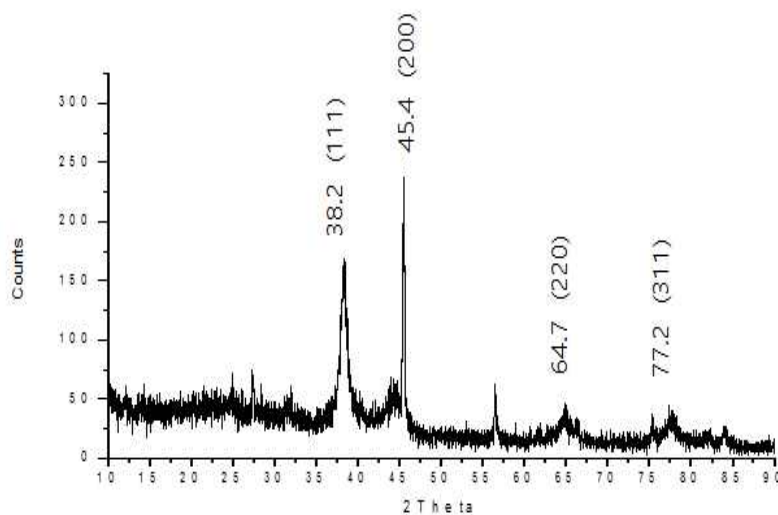


Figure 20. XRD spectrum of AuNPs prepared at optimum reaction condition. The initial concentrations of SS and HAuCl₄ were 1 mg/ml and 1 mM, respectively. The reaction was carried out at pH 7 and 70°C for 12 hours.

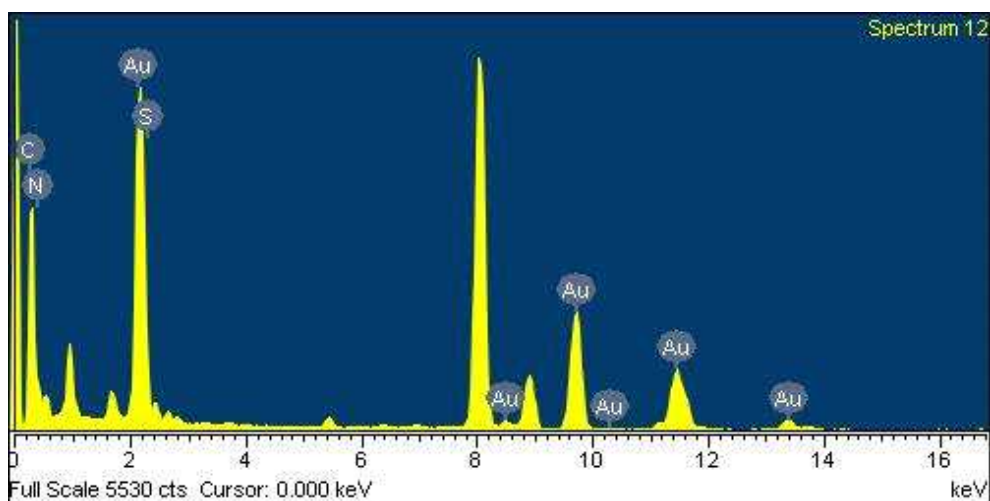


Figure 21. EDS spectral analysis of AuNPs prepared at optimum reaction condition. The initial concentrations of SS and HAuCl_4 were 1 mg/ml and 1 mM, respectively. The reaction was carried out at pH 7 and 70°C for 12 hours.

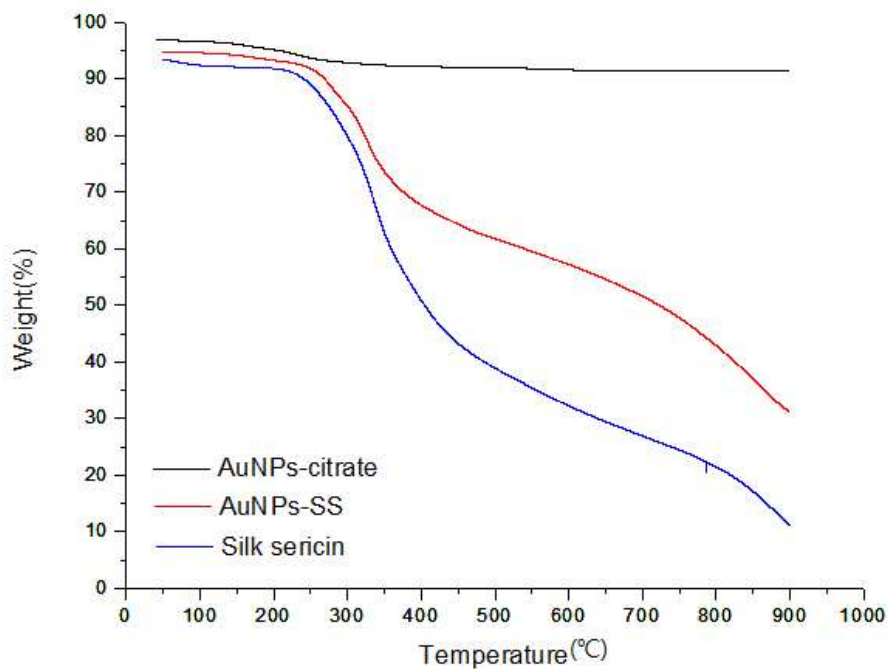


Figure 22. TGA curves of AuNPs-citrate (AuNPs synthesized by Turkevich method), AuNPs-SS (AuNPs synthesized with SS) and Silk Sericin.

따라서 실크 세리신이 금 나노입자에 어떠한 형태로 결합되어 있는지 확인하기 위하여 고분해능 투과전자현미경(HR-TEM)으로 분석하여 보았다. Figure 23 (a)를 통하여 실크 세리신이 금 나노입자를 캡핑하는 형태로 존재하는 것이 확인되었는데, 이 때 실크 세리신 캡핑의 두께는 약 0.71 ± 0.1 nm 정도였다. 또한 HR-TEM 분석에서 층간 간격이 0.233 nm 인 격자 줄무늬가 나타났는데, 이는 금의 (111)면의 격자 간격에 해당하며, 선택 영역 전자 회절 패턴(Selected-area electron diffraction pattern, SAED) 에서도 FCC 결정질 격자의 (111), (200), (220)에 대응하는 링이 관찰되었다. 이를 통해 금 나노입자임을 다시 한 번 확인하였다 (Figure 23 (b),(c)).

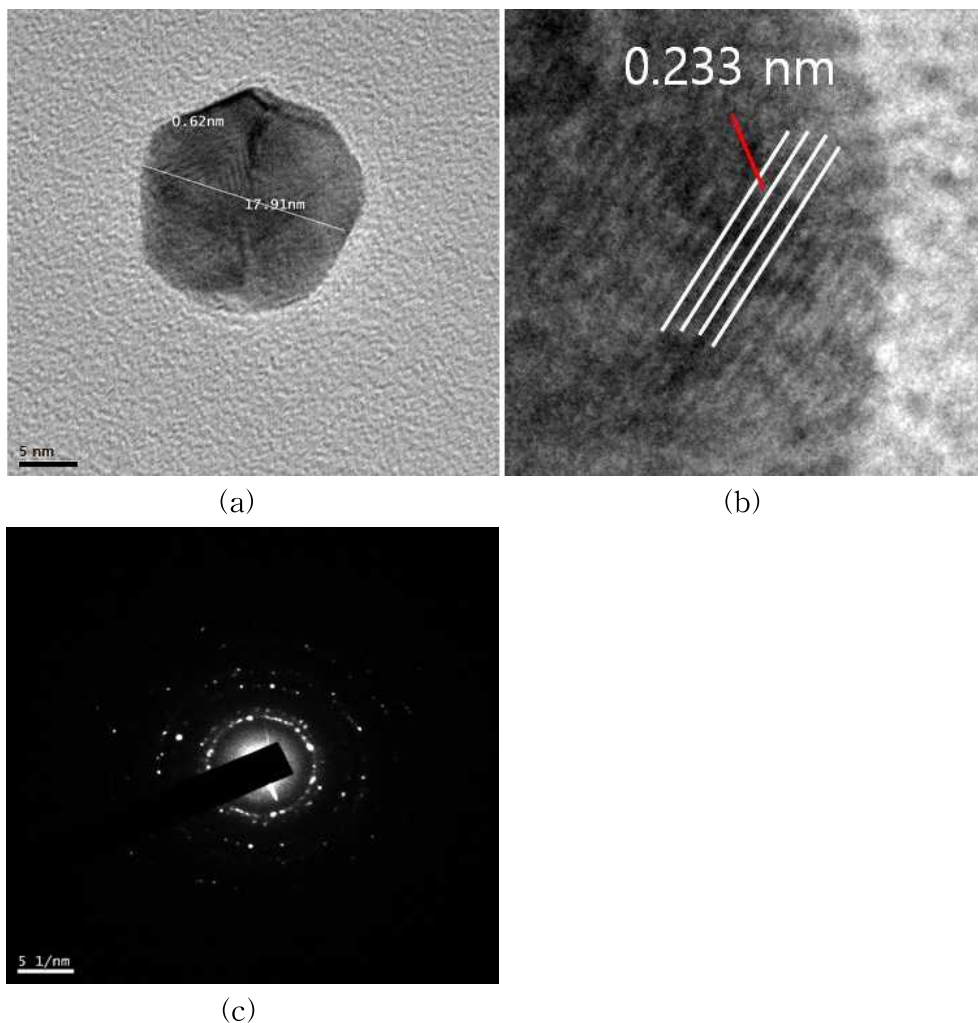


Figure 23. HR-TEM images of AuNPs prepared at optimum reaction condition: (a) AuNP diameter and capping thickness of SS, (b) lattice spacing of Au and (c) SAED pattern. The initial concentrations of SS and HAuCl_4 were 1 mg/ml and 1 mM, respectively. The reaction was carried out at pH 7 and 70°C for 12 hours.

4.3. 금 나노입자 합성에서의 실크 세리신의 역할

4.3.1. 실크 세리신 구성 아미노산에 따른 영향

금 나노입자를 친환경적으로 합성하기 위하여 식물 추출물, 탄수화물, 단백질, 지질, 미생물, 효소, 핵산 등의 생물 분자들을 이용하는 연구가 많이 이루어지고 있다 [11]. 그 중 단백질을 활용한 금 나노입자의 합성은 친환경적이고, 생체적합하며, 수용성이며, 추가 활용에 용이하다는 많은 이점을 가지고 있다 [58]. 이 때 단백질이 금 나노입자 합성에 영향을 미치는 원인을 단백질을 이루는 개별 아미노산 및 펩티드 서열에서 찾고 있다. 실크 세리신 역시 단백질이기 때문에 다양한 아미노산으로 구성되어 있다. 따라서 금 나노입자 합성에 영향을 주는 아미노산을 찾기 위해 실크 세리신에 2 mol% 이상 함유되어있는 9가지의 아미노산[18]을 이용하여 금 나노입자를 합성해보았다. 타이로신은 물에 녹지 않아 제외하였다.

9종류의 아미노산을 물에 녹인 후, 개별 아미노산의 최종 농도가 0.034 M, 전구체 HAuCl_4 는 1 mM이 되도록 혼합한 후, pH 7로 조절하고, 70°C에서 30분까지 반응을 관찰하였다. Figure 24에서 보듯이 10분 만에 아스파틱산과 글루탐산을 첨가한 용액의 색이 붉게 변하였고, 글라이신과 라이신을 사용한 경우에는 침전물이 생성되는 경향을 나타내었다. 또한 30분 후에는 알라닌과 발린을 제외한 모든 아미노산에서 반응이 나타났다. 이를 자세히 확인하기 위하여 침전이 발생한 글라이신 및 라이신과 반응이 일어나지 않는 알라닌, 발린을 제외하고, UV-Vis 분광광도계를 이용하여 SPR 피크를 확인하였다 (Figure 25). 그 결과 아스파틱산, 글루탐산, 세린의 순으로 높은 흡광도가 나타나 많은 금 나노입자

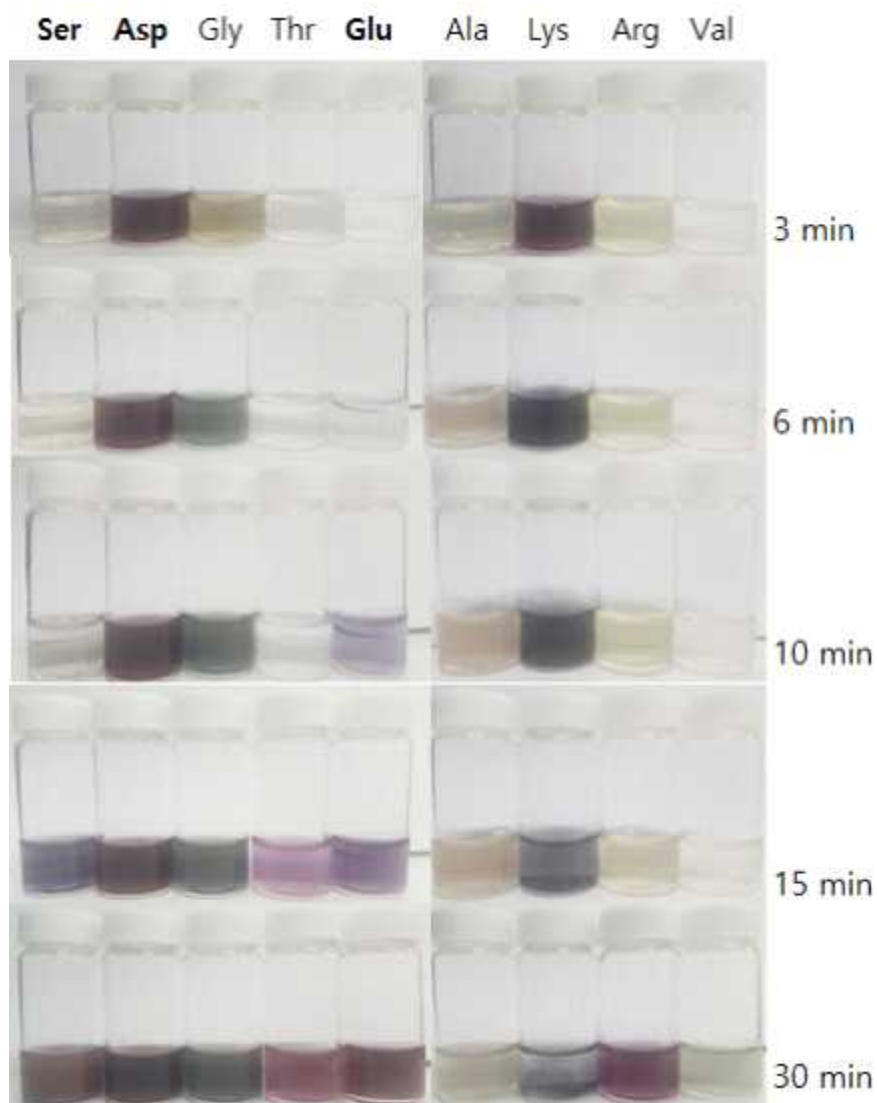


Figure 24. Optical images of gold colloids after mixing each amino acid solution with HAuCl_4 . The initial concentrations of amino acid and HAuCl_4 were 0.034 M and 1 mM, respectively. The reaction was carried out at pH 7 and 70°C for 30 mins.

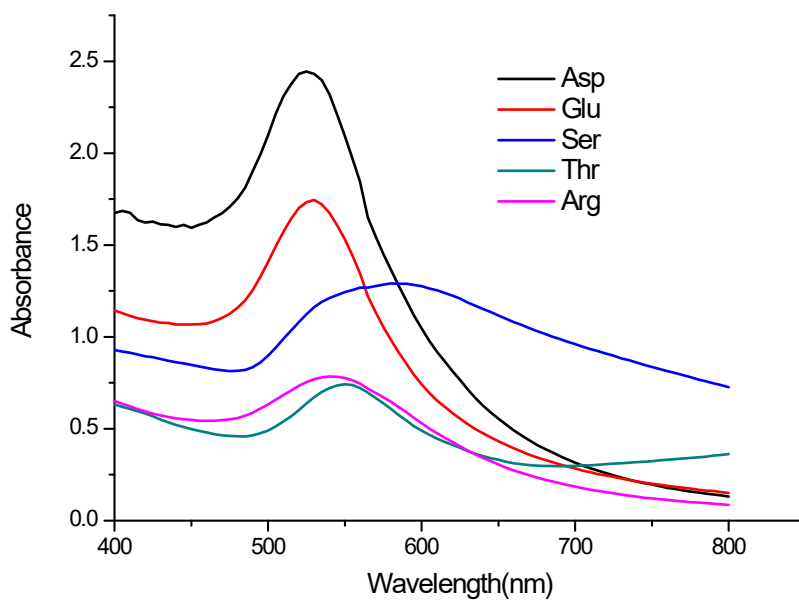


Figure 25. UV-Vis spectra of gold colloids after mixing each amino acid solution with HAuCl_4 . The initial concentrations of amino acid and HAuCl_4 were 0.034 M and 1 mM, respectively. The reaction was carried out at pH 7 and 70°C for 30 mins.

클이 생성된 것을 알 수 있었다. 트레오닌과 아르기닌에서도 약하지만 SPR 피크가 나타났다.

이상의 결과를 보면, 음전하를 가질 수 있는 아스파틱산과 글루탐산, 하이드록실기를 갖는 세린과 트레오닌이 금 나노입자 합성에 있어 효과적임을 알 수 있다. 양전하를 갖는 아르기닌의 경우에도 어느 정도 금 나노입자 합성이 가능하다는 것을 보여준다.

이들 아미노산 중 실크 세리신은 아스파틱산의 함량이 약 16 mol%에 달하며 특히 실크 세리신의 열수추출 과정에서 단백질이 열에 의해 가수분해 될 때, 아스파틱산에서 펩티드 결합이 끊어지는 것으로 알려져 있다 [83]. 이로 인하여 아스파틱산이 단백질 구조에서 외부로 노출되어 있을 것으로 예상하고 있다. 실제로 아스파틱산을 환원제로 이용해 금 나노입자를 합성한 예가 보고된 바 있다 [54]. 한편 실크 세리신에 가장 많은 함량을 가진 아미노산은 세린으로 약 34 mol% 함유되어 있다. 세린은 하이드록실기를 갖고 있는데, 하이드록실기는 AuCl_4^- 의 환원이 가능한 것으로 알려져 있다 [68]. 따라서 실크 세리신의 금 나노입자 합성에는 이 음전하를 갖을 수 있는 아미노산과 하이드록실기를 갖을 수 있는 아미노산이 복합적으로 작용하여 금 이온을 환원시키는 것으로 생각된다. 아스파틱산과 세린의 결사슬에 각각 존재하는 카르복시기와 하이드록시기의 금 나노입자 합성 메커니즘은 4.3.2.에서 설명하기로 한다.

4.3.2. 금 나노입자 합성에서의 실크 세리신의 역할 규명

앞선 결과들을 통해서 실크 세리신이 금 나노입자 합성에 있어 환원제로 작용할 수 있음을 확인하였다. 실크 세리신은 단백질로 다양한 아미노산으로 구성되어있으며, 아미노산의 말단에 존재하는 COO^- 이나 NH_3^+ 뿐만 아니라 곁사슬에 다양한 관능기를 포함하고 있다. 앞선 개별 아미노산 실험에서 확인한 바와 같이 실크 세리신에 높은 함량으로 존재하는 세린과 아스파틱산이 금 나노입자 합성에 있어서 우수한 환원제임을 확인하였다. 실크 세리신의 34 mol%를 차지하는 세린의 경우 곁사슬에 하이드록실기가 존재한다. 하이드록실기는 AuCl_4^- 을 환원시키며, 자신은 산화되어 카르보닐기를 갖게 된다. 이 때 수소 이온이 방출되며 금 나노입자 합성 후 용액의 pH가 감소하는 원인이 된다. 아스파틱산은 기존 시트르산 나트륨으로 금 나노입자를 합성했던 메커니즘에서처럼 카르복시기가 관여하여 수소이온과 이산화탄소가 부산물로 발생하는 것으로 알려져 있다. 따라서 두 아미노산이 금 나노입자 합성에 관여하는 경우 반응 후 용액내의 pH의 변화가 있을 것으로 예상되어 반응 후 용액의 pH를 측정하였다 (Figure 26). 그 결과 반응 후 pH가 7에서 5.14로 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

한편 중성 조건인 pH 7에서는 실크 세리신이 음전하를 나타낸다는 것을 Figure 2에서 확인한바 있다. 또한 실크 세리신의 농도가 낮은 경우에는 금 나노입자의 응집이 발생한 것도 확인하였다. 금 나노입자 합성에 사용되는 환원제는 금 이온을 환원시키는 것 이외에 생성된 금 나노입자를 안정하게 분산시키는 캡핑제(capping agent)의 역할을 동시에 수행하는 경우가 많다. 실크 세리신의 경우 합성 조건인 pH 7에서 음전하를 나타내므로 금 나노입자들을 정전기적 반발에 의해 분산시켜 응집을

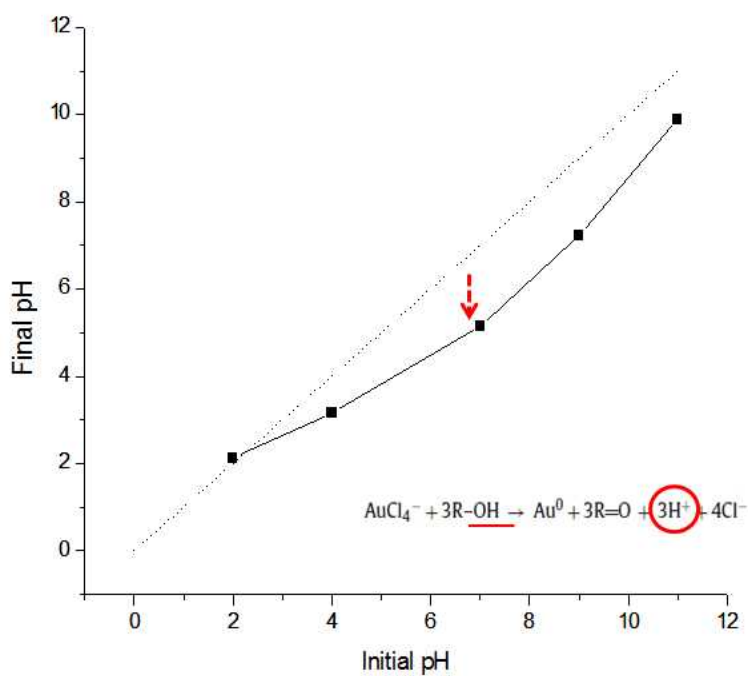


Figure 26. The change of pH of reaction media after 48 hours of reaction. The initial concentrations of SS and HAuCl₄ were 1 mg/ml and 1 mM, respectively. The reaction was carried out at 70°C.

막는 역할을 한다. 또한 이러한 효과는 실크 세리신의 농도가 낮은 경우 충분한 캡핑 효과가 없어 금 나노입자의 응집이 일어난다. 따라서 실크 세리신을 이용한 금 나노입자 합성에 있어 실크 세리신은 단순 환원제 역할뿐만 아니라 캡핑제의 역할도 하는 것으로 보인다. 실제로 Turkevich 방법에 의해 합성된 금 나노입자는 응집이 발생하였다 (Figure 27). 앞선 금 나노입자의 분석에 있어서도 EDS 및 TGA 분석을 통하여 실크 세리신이 잔존함을 확인하였으며, HR-TEM 결과에서도 금 나노입자가 실크 세리신에 의하여 캡핑된 것이 확인되었다.

이상의 결과를 바탕으로 Figure 28에서 실크 세리신과 AuCl_4^- 간의 반응을 모식화하였다. 실크 세리신은 금 이온을 환원시켜 금 결정핵 생성을 유도하는데 이 과정에서 하이드록실기와 카르복시기가 관여하는 것으로 판단된다. 또한 실크 세리신은 형성된 금 나노입자의 응집을 억제시키는 캡핑제로써의 역할도 수행한다. 특히 캡핑의 두께가 0.71 ± 0.1 nm로 매우 얇은 것은 실크 세리신이 금 나노입자 표면에 응집되어 존재하는 것이 아니라 단분자층으로 덮고 있을 것으로 예상된다.

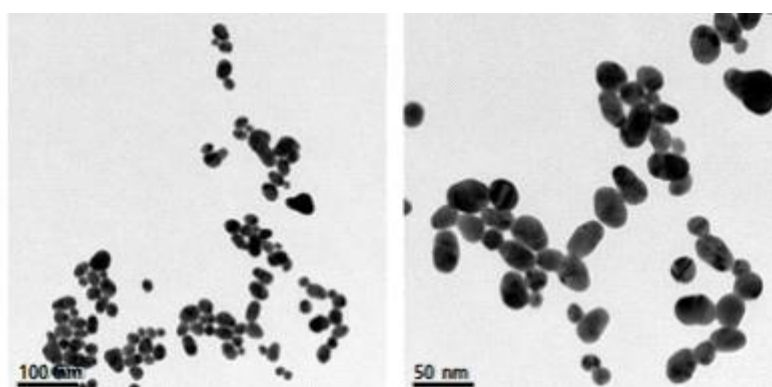


Figure 27. EF-TEM images of AuNPs synthesized by Turkevich method.

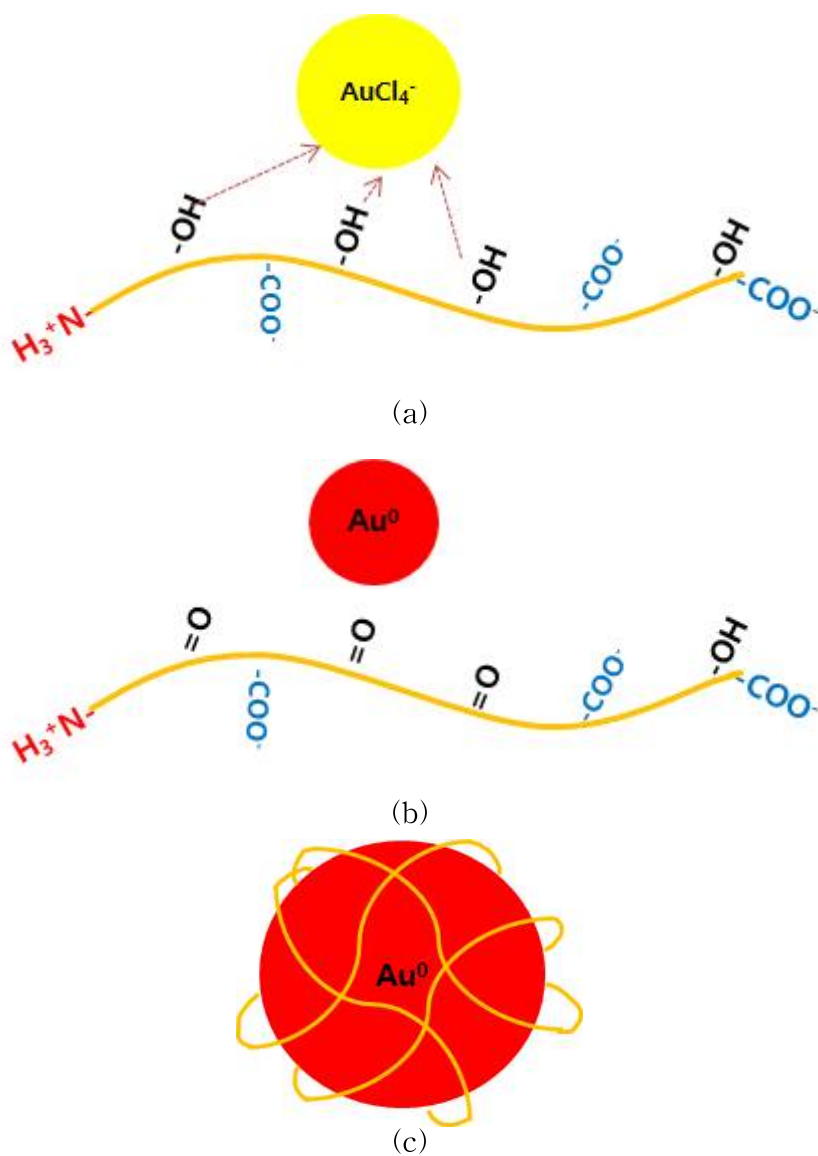


Figure 28. Proposed role of SS during the synthesis of AuNPs: (a) reduction of gold ion by hydroxyl groups, (b) formation of Au nuclei and (c) final model of SS capped AuNP.

4.4. 실크 세리신으로 캡핑된 금 나노입자의 응용

금 나노입자는 표면에 다양한 분자를 결합하여 여러 분야에서 활용되고 있다. 가장 많이 쓰이는 방법은 Turkevich 방법으로 합성된 금 나노입자에 금과의 결합력이 우수한 싸이올기반 안정제를 이용하여 원래 약하게 캡핑된 시트르산나트륨을 치환한 후 생체 분자를 도입한다. 그러나 본 연구에서 제조된 금 나노입자는 실크 세리신으로 캡핑되어 있으며, 실크 세리신의 다양한 작용기가 있어 곧 바로 생체 분자를 도입할 수 있을 것으로 기대된다. 이를 확인하기 위하여 모델 분자로 FITC 형광 염료의 부착 가능성을 확인하여보았다. Figure 29에서 형광현미경으로 금 나노입자를 확인하여 본 결과, 시트르산나트륨으로 합성한 금 나노입자는 형광을 전혀 띠지 않았으며, 실크 세리신으로 합성한 금 나노입자의 경우 약한 형광을 띠고 있었다. 이는 금 나노입자를 캡핑하는 실크 세리신이 약한 형광을 띠기 때문이다. 반면 FITC를 도입한 금 나노입자에 경우 강한 형광을 띠는 것을 확인할 수 있었다.

즉 기존에 바이오컨쥬게이션을 위해 싸이올기반 안정제 또는 표면 개질제를 첨가하던 방식과 다르게 환원제가 리간드 역할을 동시에 할 수 있다는 장점이라고 할 수 있다. 따라서 이러한 실크 세리신에 형광 염료뿐 아니라 항체나 단백질, 약물 등을 도입하여 금 나노입자를 라벨링, 약물 전달체, 바이오센서, 바이오이미징, 진단용 등 바이오메디컬 분야 생체적합한 재료로 응용할 수 있을 것이다.

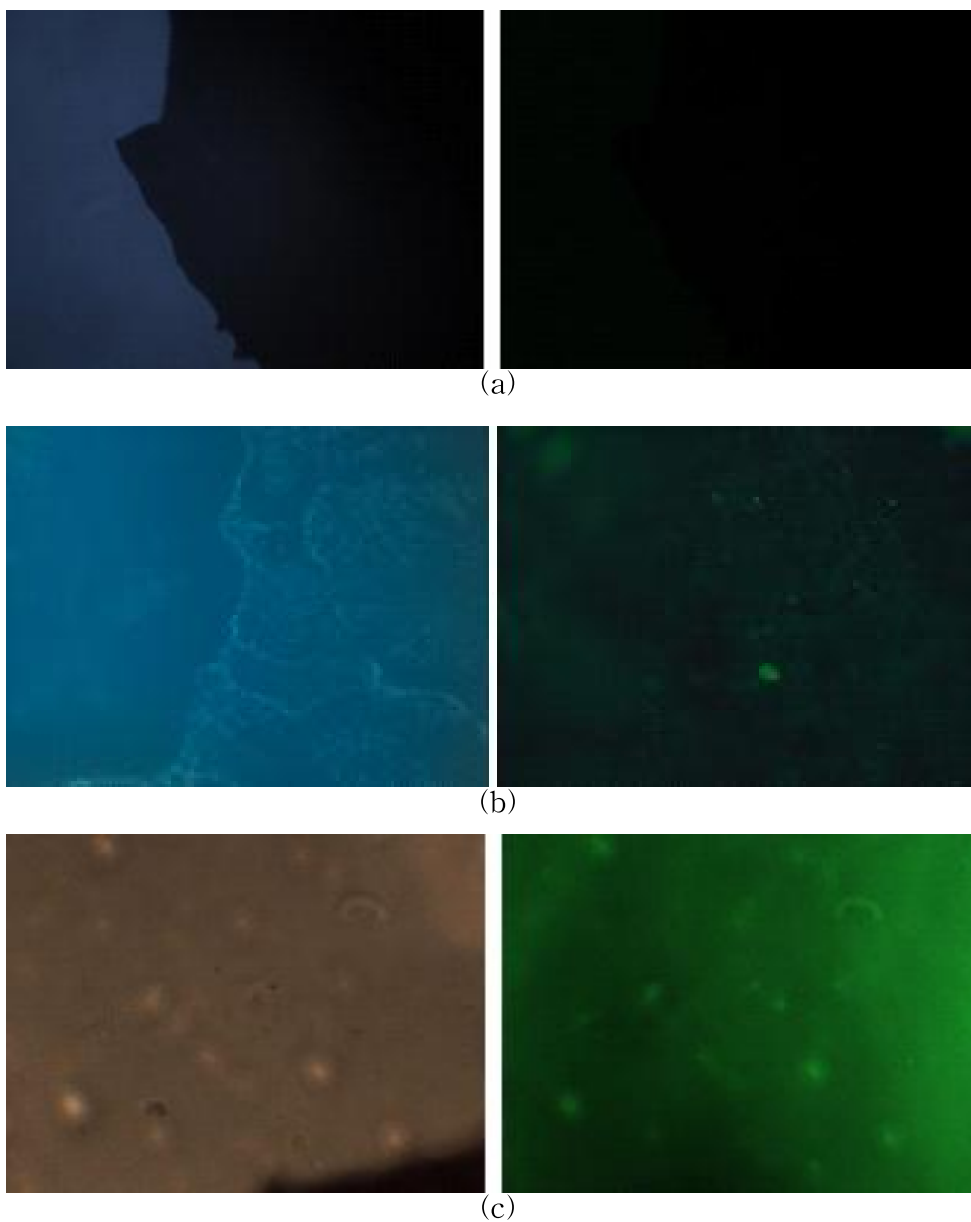


Figure 29. Fluorescent microscope images of AuNPs synthesized by Turkevich method (a), SS capped AuNPs (b) and FITC labeled SS capped AuNPs (c): (left) optical microscope, (right) fluorescent microscope images.

제 5 장 결 론

본 연구에서는 실크 세리신을 환원제 및 캡핑제로 사용하여 친환경적이고 용이한 방법으로 금 나노입자를 합성하는 최적 조건을 찾고자 하였다. 또한 금 나노입자의 합성 과정에서 실크 세리신의 역할을 구명하고자 하였다. 마지막으로 제조된 금 나노입자의 응용 가능성을 확인하였다. 본 연구를 통하여 얻은 결과는 다음과 같다.

1. 금 나노입자를 합성하는 최적 pH 조건을 찾은 결과 pH 7에서 가장 안정적으로 금 나노입자의 합성이 가능하였다. 실크 세리신의 농도는 1 mg/ml에서 응집 없이 금 나노입자를 합성할 수 있었다. 반응 온도가 높을수록 반응 시간은 감소시킬 수 있었으나 70℃에서 12시간 이상 반응 시켰을 때에 가장 안정한 금 나노입자가 합성되었다.
2. 실크 세리신의 이차 구조의 변화를 주기 위해서 에탄올 첨가한 결과 보다 빠른 시간 내에 반응이 진행되었으며, 금 나노입자의 크기도 증가하였다. 이는 실크 세리신의 이차 구조가 β -sheet로 전이되면서 하이드록실기나 카르복시기가 정렬되어 템플릿으로 역할을 하기 때문으로 판단하였다.
3. 실크 세리신을 구성하는 아미노산 중 하이드록실기와 카르복시기를 갖는 아미노산들이 금 나노입자 합성에 효과적이었다. 따라서 실크 세리신에 의한 금 이온의 환원은 이들 아미노산에 기인한 것으로 판단하였다.
4. 금 나노입자의 분석 결과 금 고유의 FCC 구조가 관찰되었으며, 실크 세리신이 금 나노입자를 단분자층으로 캡핑하는 것을 확인할 수 있었

다. 또한 추가적인 표면 개질제의 사용 없이 FITC의 도입이 가능하였다.

본 연구를 통해 실크 세리신이 금 나노입자 합성에 환원제 및 캡핑제의 역할을 하는 것을 알 수 있었으며, 향후 제조된 금 나노입자가 진단 또는 바이오이미징 등 바이오메디칼 분야에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

- [1] M.A. Meyers, P.Y. Chen, A.Y.M. Lin, Y. Seki, Biological Materials: Structure and Mechanical Properties, *Progress in Materials Science* **53**, 1 - 206 (2008).
- [2] C.C. Perry, T.K. Tucker, Biosilicification: The Role of Organic Matrix in Structure Control, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **5**, 537-550 (2000).
- [3] C. Groger, K. Lutz, E. Brunner, Biomolecular Self-assembly and its Relevance in Silica Biomineralization, *Cell Biochemistry and Biophysics* **50**, 23-39 (2008).
- [4] E. Ohnishi, S.Y. Takahashi, H. Sonobe, T. Hayashi, Crystals from Cocoons of *Malacosoma neustria* testacea, *Science* **17**, 783-784 (1968).
- [5] A. Takeuchi, C. Ohtsuki, T. Miyazaki, H. Tanaka, M. Yamazaki, M. Tanihara, Deposition of Bone-like Apatite on Silk Fiber in a Solution that Mimics Extracellular Fluid, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **65**, 283-289 (2003).
- [6] J.Y. Lee, K.H. Lee, Synthesis of Silica using Silk Sericin without Hydrolysis of Tetraethyl Orthosilicate, *International Journal of Industrial Entomology* **27**, 298-302 (2013).
- [7] M.Y. Yang, G.S. Zhou, Y.J. Shuai, J. Wang, L.J. Zhu, C.B. Mao, Ca^{2+} -induced Self-assembly of *Bombyx mori* Silk Sericin into a Nanofibrous Network-like Protein Matrix for Directing Controlled Nucleation of Hydroxylapatite Nano-needles, *Journal of Materials Chemistry B* **3**, 2455 - 2462 (2015).

- [8] H.W. Kwak, M. Shin, H. Yun, K.H. Lee, Preparation of Silk Sericin/Lignin Blend Beads for the Removal of Hexavalent Chromium Ions, *International Journal of Molecular Sciences* **17**, 1466 (2016)
- [9] J. Turkevich, P.C. Stevenson, J. Hillier, A study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold, *Discussions of the Faraday Society* **11**, 55–75 (1951).
- [10] M.F. Zarabi, N. Arshadi, A. Farhangi, A. Akbarzadeh, Preparation and Characterization of Gold Nanoparticles with Amino Acids, Examination of Their Stability, *Indian Journal of Clinical Biochemistry* **29**, 306 - 314 (2014).
- [11] M. Shah, V. Badwaik, Y. Kherde, H.K. Waghwani, T. Modi, Z.P. Aguilar, H. Rodgers, W. Hamilton, T. Marutharaj, C. Webb, M.B. Lawrenz, R. Dakshinamurthy, Gold Nanoparticles: Various Methods of Synthesis and Antibacterial Applications, *Frontiers in Bioscience* **19**, 1320–1344 (2014).
- [12] S. Alex, A. Tiwari, Functionalized Gold Nanoparticles: Synthesis, Properties and Applications—A Review, *Journal of Nanoscience And Nanotechnology* **15**, 2015–2019 (2015).
- [13] S. Mann, B.R. Heywood, S. Rajam, V.J. Wade, Molecular Recognition in Biomineralization, *Mechanisms and Phylogeny of Mineralization in Biological Systems*, 47–55 (1991).
- [14] B.L. Smith, T.E. Schaffer, M. Viani, J.B. Thompson, N.A. Frederick, J. Kindt, A. Belcher, G.D. Stucky, D.E. Morse, P. K. Hansma, Molecular Mechanistic Origin of the Toughness of Natural Adhesives, Fibres and Composites. *Nature* **399**, 761–763 (1999)

- [15] P.A. Nakata, Advances in Our Understanding of Calcium oxalate Crystal Formation and Function in Plants, *Plant Science* **164**, 901–909 (2003).
- [16] S. Mann, *Biomineralization: Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry*, New York, Oxford University Press (2001).
- [17] B.L. Smith, T.E. Schaffer, M. Viani, J.B. Thompson, N.A. Frederick, J. Kindt, A. Belcher, G.D. Stucky, D.E. Morse, P.K. Hansma, Molecular Mechanistic Origin of the Toughness of Natural Adhesives, Fibres and Composites. *Nature* **399**, 761–763 (1999).
- [18] H. Oh, The Effect of Physiochemical Properties of Silk Sericin on the Silica Synthesis, Ph.D. thesis, Seoul, Seoul National University (2014).
- [19] H. Teramoto, M. Miyazawa, Molecular Orientation Behavior of Silk Sericin Film as Revealed by ATR Infrared Spectroscopy, *Biomacromolecules* **6**, 2049–2057 (2005).
- [20] A. Takeuchi, C. Ohtsuki, T. Miyazaki, M. Kamitakahara, S.I. Ogata, M. Yamazaki, Y. Furutani, H. Kinoshita, M. Tanihara, Heterogeneous Nucleation of Hydroxyapatite on Protein: Structural Effect of Silk Sericin, *Journal of the Royal Society Interface* **2**, 373 – 378 (2005).
- [21] M. Yang, Y. Shuai, C. Zhang, Y. Chen, L. Zhu, C. Mao, H. Ouyang, Biomimetic Nucleation of Hydroxyapatite Crystals Mediated by *Antheraea pernyi* Silk Sericin Promotes Osteogenic Differentiation of Human Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells,

Biomacromolecules **15**, 1185–1193 (2014).

[22] Y. Cai, J. Jin, D. Mei, N. Xia, J. Yao, Effect of Silk Sericin on Assembly of Hydroxyapatite Nanocrystals into Enamel Prism-like Structure, *Journal of Materials Chemistry* **19**, 5751 - 5758 (2009).

[23] R.B. Zhao, H.F. Han, S. Ding, Z.H. Li, X.D. Kong, Effect of silk sericin on morphology and structure of calcium carbonate crystal, *Frontiers in Material Science* **7**, 177–183 (2013)

[24] M.A. Khosa, S.S. Shah, X. Feng, Metal Sericin Complexation and Ultrafiltration of Heavy Metals from Aqueous Solution, *Chemical Engineering Journal* **244**, 446 - 456 (2014).

[25] X. Chen, K.F. Lam, S.F. Mak, K.L. Yeung, Precious Metal Recovery by Selective Adsorption Using Biosorbents, *Journal of Hazardous Materials* **186**, 902 - 910 (2011).

[26] H.W. Kwak, Y. Kim, N.K. Yun, K.H. Lee, Silk Sericin Microparticles as a Biosorbent for Hexavalent Chromium Ion, *Macromolecular Research* **22**, 788–795 (2014).

[27] H.W. Kwak, Y.S. Yang, M.K. Kim, J.Y. Lee, H. Yun, M.H. Kim, K.H. Lee, Chromium(VI) Adsorption Behavior of Silk Sericin Beads, *International Journal of Industrial Entomology* **26**, 47–53 (2013).

[28] J. Cui, L. Zhang, Metallurgical Recovery of Metals from Electronic Waste: A review, *Journal of Hazardous Materials* **158**, 228 - 256 (2008).

[29] C. Mack, B. Wilhelmi, J.R. Duncan, J.E. Burges, Biosorption of Precious Metals, *Biotechnology Advances* **25**, 264 - 271 (2007).

[30] K. Fujiwara, A. Ramesh, T. Maki, H. Hasegawa, K. Ueda,

Adsorption of Platinum(IV), Palladium(II) and Gold(III) from Aqueous Solutions onto L-lysine Modified Crosslinked Chitosan Resin, *Journal of Hazardous Materials* **146**, 39 - 50 (2007).

[31] P. Aramwit, N. Bang, J. Ratanavaraporn, S. Ekgasit, Green Synthesis of Silk Sericin-capped Silver Nanoparticles and their Potent Anti-bacterial Activity, *Nanoscale Research Letters* **9**, 79 (2014).

[32] T.J. Norman, C.D. Grant, D. Magana, J.Z. Zhang, Near Infrared Optical Absorption of Gold Nanoparticle Aggregates, *Journal of Physical Chemistry B* **106**, 7005-7012 (2002).

[33] C.J. Murphy, T.K. Sau, A.M. Gole, C.J. Orendorff, J. Gao, L. Gou, S.E. Hunyadi, T. Li, Anisotropic Metal Nanoparticles: Synthesis, Assembly, and Optical Applications, *Journal of Physical Chemistry B* **109**, 13857-13870 (2005).

[34] V. Amendola, M. Meneghetti, Size Evaluation of Gold Nanoparticles by UV-vis Spectroscopy, *Journal of Physical Chemistry C* **113**, 4277 - 4285 (2009).

[35] S. Eustis, A. El-Sayed, Why Gold Nanoparticles are more Precious than Pretty Gold: Noble Metal Surface Plasmon Resonance and its Enhancement of the Radiative and Nonradiative Properties of Nanocrystals of Different Shapes, *Chemical Society Reviews* **35**, 209-217 (2006).

[36] R. Jin, Y.W. Cao, C.A. Mirkin, K.L. Kelly, G.C. Schatz, J.G. Cheng, Photoinduced Conversion of Silver Nanospheres to Nanoprisms, *Science* **294**, 1901-1903 (2001).

[37] S.R. Hall, W. Shenton, H. Engelhardt, S. Mann, Site-specific

Organization of Gold Nanoparticles by Biomolecular Templating, *Chemphyschem* **2**, 141–191 (2001).

[38] K. Okitsu, M. Ashokkumar, F. Grieser, Sonochemical Synthesis of Gold Nanoparticles: Effects of Ultrasound Frequency, *Journal of Physical Chemistry B* **109**, 20673–20675 (2005).

[39] M.H. Magnusson, K. Deppert, J.O. Malm, J.O. Bovin, L. Samuelson, Gold Nanoparticles: Production, Reshaping, and Thermal Charging, *Journal of Nano Research* **1**, 243–251 (1999).

[40] S. Sun, P. Mendes, K. Critchley, S. Diegoli, M. Hanwell, S.D. Evans, G.J. Leggett, J.A. Preece, T.H. Richardson, Fabrication of Gold Micro and Nanostructures by Photolithography Exposure of Thiol Stabilized Gold Nanoparticles, *Nano Letters* **6**, 345–350 (2006).

[41] P.A. Schaal, A. Besmehn, E. Maynicke, M. Noyong, B. Beschoten, U. Simon, Electrically Conducting Nanopatterns Formed by Chemical e-Beam Lithography via Gold Nanoparticle Seeds, *Langmuir* **28**, 2448–2454 (2012).

[42] S.R. Makhsin, K.A. Razak, R. Noordin, N.D. Zakaria, T.S. Chun, The Effects of Size and Synthesis Methods of Gold Nanoparticle-conjugated MaHIgG₄ for Use in an Immuno-chromatographic Strip Test to Detect Brugian Filariasis, *Nanotechnology* **23** 495–719 (2012).

[43] N.R. Jana, L. Gearheart, C.J. Murphy, Evidence for Seed-Mediated Nucleation in the Chemical Reduction of Gold Salts to Gold Nanoparticles, *Chemistry of Materials* **13**, 2313–2322 (2013).

[44] T.K. Sau, C.J. Murphy, Room temperature, High yield synthesis

of multiple shapes of gold nanoparticles in aqueous solution, *Journal Of The American Chemical Society* **126**, 8648–8649 (2004).

[45] N.R. Jana, L. Gearheart and C.J. Murph, Seed Mediated Growth Approach for Shape Controlled Synthesis of Spheroidal and Rod-like Gold Nanoparticles Using a Surfactant Template, *Chemistry of Materials* **12**, 1389–1392 (2001).

[46] Y. Chen, X. GU, C.G. Nie, Z.Y. Jiang, Z.X. Xie, Z.J. Lin, Shape Controlled Growth of Gold Nanoparticles by a Solution Synthesis, *Chemical Communications*, 4181–4183 (2005).

[47] C.R. Bridges, P.M. Dicarmine, A. Fokina, D. Huesmann, D.S. Seferos, Synthesis of Gold Nanotubes with Variable Wall Thickness, *Journal of Materials Chemistry A* **1**, 1127–1133 (2013).

[48] R.K. Petla, S. Vivekanandhan, M. Misra, A.K. Mohanty, N. Satyanarayana, Soybean (Glycine max) Leaf Extract Based Green Synthesis of Palladium Nanoparticles, *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology* **3**, 14–19 (2012).

[49] S. Hu, Y.L. Hsieh, Silver Nanoparticle Synthesis Using Lignin as Reducing and Capping Agents: A kinetic and Mechanistic Study, *International Journal of Biological Macromolecules* **82**, 856 - 862 (2016).

[50] P. Mohanpuria, N.K. Rana, S.K. Yadav, Biosynthesis of Nanoparticles: Technological Concepts and Future Applications, *Journal of Nanoparticle Research* **10**, 507–517 (2008).

[51] E.G.A. Miranda, A. Tofanello, A.M.M. Brito, D.M. Lopes, L.J.C. Albuquerque, C.E. Castro, F.N. Costa, F.C. Giacomelli, F.F. Ferreira,

J.C. Araújo-Chaves, I.L. Nantes, Effects of Gold Salt Speciation and Structure of Human and Bovine Serum Albumins on the Synthesis and Stability of Gold Nanostructures, *Frontiers in Chemistry* **4**, (2016).

[52] Z. Li, T. Yang, The Application of Biomolecules in the Preparation of Nanomaterials, *Biomedical Engineering-Frontier and Challenges*, Intechopen, 319-334 (2011)

[53] J.M. Slocik, M.O. Stone, R.R. Naik, Synthesis of Gold Nanoparticles Using Multifunctional Peptides, *small* **1**, 1048 - 1052 (2005).

[54] S. Mandal, P.R. Selvakannan, S. Phadtare, R. Pasricha, M. Sastry, Synthesis of a Stable Gold Hydrosol by the Reduction of Chloroaurate ions by the Amino Acid, Aspartic Acid, *Indian Academy of Sciences* **114**, 513-520 (2002).

[55] D. Toroz, S. Corni, Peptide Synthesis of Gold Nanoparticles: The Early Steps of Gold Reduction Investigated by Density Functional Theory, *Nano Letters* **11**, 1313-1318 (2011).

[56] R. Le'vy, N.T.K. Thanh, R.C. Doty, I. Hussain, R.J. Nichols, D.J. Schiffrin, M. Brust, D.G. Fernig, Rational and Combinatorial Design of Peptide Capping Ligands for Gold Nanoparticles, *Journal of The American Chemical Society* **126**, 10076-10084 (2004).

[57] A.V. Singh, B.M. Bandgar, M. Kasture, B.L.V. Prasad, M. Sastry, Synthesis of Gold, Silver and their Alloy Nanoparticles Using Bovine Serum Albumin as Foaming and Stabilizing Agent, *Journal of Materials Chemistry* **15**, 5115-5121 (2005).

- [58] Y. Xu, J. Sherwood, Y. Qin, D. Crowley, M. Bonizzonic, Y. Bao, The Role of Protein Characteristics in the Formation and Fluorescence of Au Nanoclusters, *Nanoscale* **6**, 1515 - 1524 (2014).
- [59] K.B. Narayanan, N. Sakthivel, Biological Synthesis of Metal Nanoparticles by Microbes, *Advances in Colloid and Interface Science* **156**, 1 - 13 (2010).
- [60] P. Mukherjee, A. Ahmad, D. Mandal, S. Senapati, S.R. Sainkar, M.I. Khan, R. Ramani, R. Parischa, P.V. Ajayakumar, M. Alam, M. Sastry, R. Kumar, Bioreduction of AuCl_4^- Ions by the Fungus, *Verticillium sp.* and Surface Trapping of the Gold Nanoparticles Formed, *Angewandte Chemie-International Edition* **40**, 3585-3588 (2001).
- [61] M. Gericke, A. Pinches, Biological Synthesis of Metal Nanoparticles, *Hydrometallurgy* **83**, 132-140 (2006).
- [62] P. Mohanpuria, N.K. Rana, S.K. Yadav, Biosynthesis of Nanoparticles: Technological Concepts and Future Applications, *Journal of Nanoparticle Research* **10**, 507-517 (2008).
- [63] E. Romera, F. Gonzalez, A. Ballester, M.L. Blazquez, J.A. Muñoz, Comparative Study of Biosorption of Heavy Metals Using Different Types of Algae, *Bioresource Technology* **98**, 3344 - 3353 (2007).
- [64] J. Huang, Q. Li, D. Sun, Y. Lu, Y. Su, X. Yang, H. Wang, Y. Wang, W. Shao, N. He, J. Hong, C. Chen, Biosynthesis of Silver and Gold Nanoparticles by Novel Sundried Cinnamomum camphora leaf, *Nanotechnology* **18**, 105104 (2007).

- [65] H. Huang, X. Yang, Synthesis of Polysaccharide-stabilized Gold and Silver Nanoparticles: a Green Method, *Carbohydrate Research* **339**, 2627 - 2631 (2004).
- [66] T. Maruyama, Y. Fujimoto, T. Maekawa, Synthesis of Gold Nanoparticles Using Various Amino Acids, *Journal of Colloid and Interface Science* **447**, 254 - 257 (2015).
- [67] Y. Konishi, T. Tsukiyama, K. Ohno, N. Saitoh, T. Nomura, S. Nagamine, Intracellular Recovery of Gold by Microbial Reduction of AuCl_4^- Ions Using the Anaerobic Bacterium *Shewanella algae*, *Hydrometallurgy* **81**, 24 - 29 (2006).
- [68] Y.N. Mata, E. Torres, M.L. Blazquez, A. Ballester, F. Gonzalez, J.A. Mu~noz, Gold(III) Biosorption and Bioreduction with the Brown Alga *Fucus Vesiculosus*, *Journal of Hazardous Materials* **166**, 612 - 618 (2009).
- [69] E.C. Cho, Q. Zhang, Y. Xia, The Effect of Sedimentation and Diffusion on Cellular Uptake of Gold Nanoparticles, *Nature Nanotechnology* **6**, 385-391 (2011).
- [70] F. Kim, K. Sohn, J. Wu, J. Huang, Chemical Synthesis of Gold Nanowires in Acidic Solutions, *Journal of The American Chemical Society* **130**, 14442-14443 (2008).
- [71] B. Liu, J. Xie, J.Y. Lee, Y.P. Ting, J. Paul Chen, Optimization of High-yield Biological Synthesis of Single Crystalline Gold Nanoplates, *Journal of Physical Chemistry B* **109**, 15256-15263 (2005).
- [72] N. Zhao, Y. Wie, N. Sun, Q. Chen, J. Bai, L. Zhou, Y. Qin, M. Li, L. Qi, Controlled Synthesis of Gold Nanobelts and Nanocombs in

- Aqueous Mixed Surfactant Solutions, *Langmuir* **24**, 991–998 (2008).
- [73] L. Li, J. Weng, Enzymatic Synthesis of Gold Nanoflowers with Trypsin, *Nanotechnology* **21**, 10 (2010).
- [74] H. Yuan, C.G. Khoury, H. Hwang, C.M. Wilson, G.A. Grant, T. Vo-Dinh, Gold Nanostars: Surfactant Free Synthesis, 3D Modelling, and Two-photon Photoluminescence Imaging, *Nanotechnology* **23**, 75–102 (2012).
- [75] W. Patungwasa, J.H. Hodak, pH Tunable Morphology of the Gold Nanoparticles Produced by Citrate Reduction, *Materials Chemistry and Physics* **108**, 45 - 54 (2008).
- [76] C. Li, D. Li, G. Wan, J. Xu, W. Hou, Facile Synthesis of Concentrated Gold Nanoparticles with Low Size-distribution in Water: Temperature and pH Controls, *Nanoscale Research Letters* **6**, 440 (2011).
- [77] X. Ji, X. Song, J. Li, Y. Bai, W. Yang, X. Peng, Size Control of Gold Nanocrystals in Citrate Reduction: The Third Role of Citrate, *Journal of The American Chemical Society* **129**, 13939–13948 (2007).
- [78] N.G. Bastus, J. Comenge, V. Puntès, Kinetically Controlled Seeded Growth Synthesis of Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles of up to 200 nm: Size Focusing versus Ostwald Ripening, *Langmuir* **27**, 11098 - 11105 (2011).
- [79] M. Grzelczak, J. Pe´rez-Juste, P. Mulvaney, L.M. Liz-Marza´n, Shape Control in Gold Nanoparticle Synthesis, *Chemical Society Reviews* **37**, 1783–1791 (2008).
- [80] R.A. Sperling, P.R. Gil, F. Zhang, M. Zanella, W.J. Parak,

Biological Applications of Gold Nanoparticles, *Chemical Society Reviews* **37**, 1896–1908 (2008)

[81] A.C. Templeton, W.P. Wuelfing, R.W. Murray, Monolayer-protected Cluster Molecules, *Accounts of Chemical Research* **33**, 27 - 36 (2000).

[82] H. Oh, J.Y Lee, A. Kim, C.S. Ki, J.W. Kim, Y.H. Park, K.H. Lee, Preparation of Silk Sericin Beads Using LiCl/DMSO Solvent and their Potential as a Drug Carrier for Oral Administration, *Fibers and Polymers* **8**, 470–476 (2007).

[83] H. Teramoto, A. Kakazu, T. Asakura, Native Structure and Degradation Pattern of Silk Sericin Studied by ^{13}C NMR Spectroscopy, *Macromolecules* **39**, 6–8 (2006).

Abstract

Green Synthesis of Gold Nanoparticles Using Silk Sericin as Reducing and Capping Agent

MunJu Shin

Biomaterials Engineering

The Graduate School

Seoul National University

Recently, various natural materials have been used for the synthesis of gold nanoparticles (AuNPs). These natural materials are attracting attentions because they are more environmentally friendly than conventional chemicals used for AuNPs synthesis. Silk sericin(SS) is a protein that is removed during the silk degumming process and has been studied for the synthesis of several inorganic materials such as hydroxyapatite and silica. In this study, we tried to synthesize AuNPs using SS. For optimizing the conditions for the synthesis of AuNPs, the effect of reaction pH, concentration of SS, reaction time and temperature during the formation of AuNPs was observed by visual observation, UV-Vis spectrophotometer, and

EF-TEM. As a result, when the concentration of HAuCl_4 was 1 mM, the optimum conditions for synthesizing AuNPs using SS was SS concentration of 1 mg/ml, reaction pH at 7, reaction temperature at 70°C and reaction time of 12 hours. The prepared AuNPs at the optimum condition had a size of about 17 nm and the particles were well dispersed. In addition, when ethanol was added, the secondary structure of SS was transited to β -sheet, and the size of gold nanoparticles increased to about 20 nm and the amount of AuNPs was also increased. It was confirmed that the amino acids bearing a hydroxyl group or negative charge are effective in the synthesis of AuNPs, and, in the case of SS, those amino acids exist at a high content. Therefore, the SS consisted of these amino acids can reduce gold ions, and finally, induce the synthesis of AuNPs. In addition, HR-TEM, EDS, and TGA analysis revealed that SS remained in the form of capping the synthesized AuNPs. FITC fluorescent dye could be directly introduced to AuNPs by covalent bonding to SS.

Keywords : gold nanoparticles, silk sericin, biomineralization,
reducing agent, capping agent, green synthesis

Student Number : 2015-23029